



MICROBIO DIVERSAR
collezioni microbiche della Sardegna



Conservazione, tutela e valorizzazione della agrobiodiversità microbica della Sardegna



REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

Agris

Agenzia pro sa chirca in agricultura
Agenzia regionale per la ricerca in agricultura



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI



Università degli Studi
di Cagliari



OSPEDALE POLICLINICO SAN MARTINO
Sistema Sanitario Regione Liguria
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

mipaaf

ministero delle politiche
agricole alimentari e forestali



INDICE

Introduzione

Raffaele Cherchi	pag. 3
Gianni Ibba	pag. 4
Roberta Comunian	pag. 6

La legge 194/2015 “Disposizioni per la Tutela e la Valorizzazione della Biodiversità di Interesse Agricolo e Alimentare”: stato di attuazione	pag. 8
--	---------------

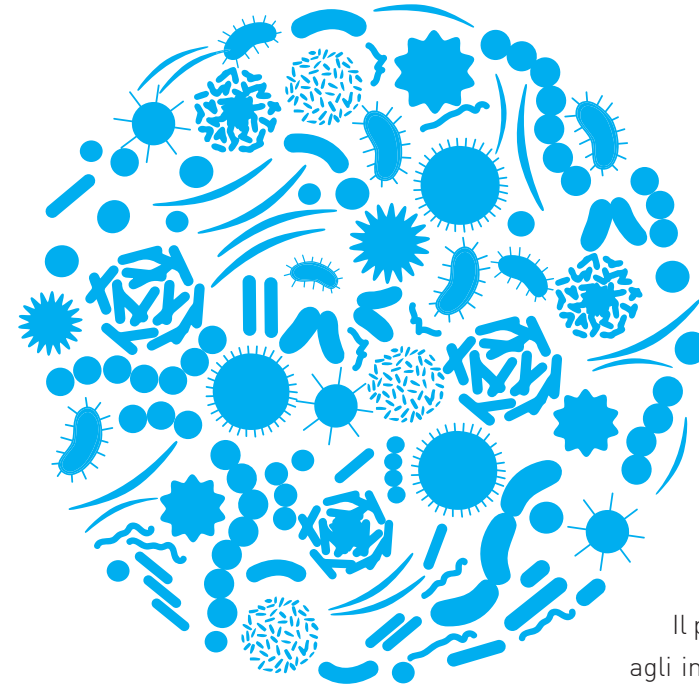
La tutela della agrobiodiversità in Sardegna e le proposte di modifica della Legge regionale n. 16/2014	pag. 12
--	----------------

La storia, l'organizzazione e le possibili applicazioni delle collezioni microbiche della Sardegna

LA COLLEZIONE AGRIS BNSS	pag. 18
LA COLLEZIONE UNISS	pag. 27
LA COLLEZIONE UNICA	pag. 32

Portale sulla Biodiversità Microbica della Sardegna e del database dei cataloghi delle tre collezioni sarde di microorganismi di interesse agroalimentare	pag. 39
--	----------------

Le collezioni e la Joint Research Unit (JRU) MIRRI.IT: il network italiano delle risorse microbiche	pag. 44
--	----------------



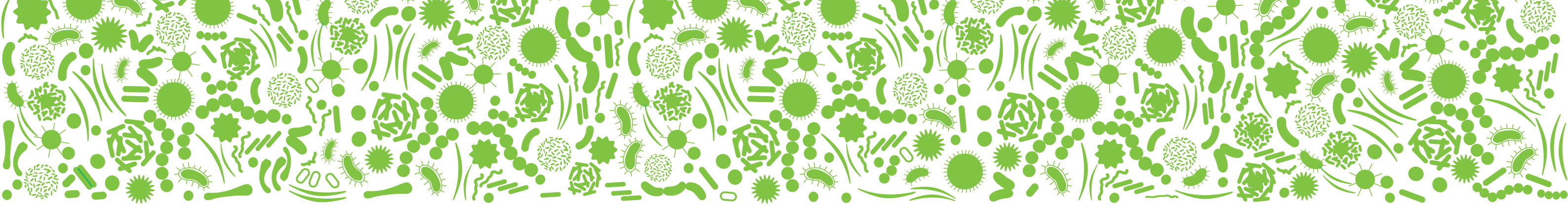
Come Commissario straordinario dell’Agris e, quindi, nel mio ruolo temporaneo di guida dell’Agenzia di ricerca in Agricoltura della Regione Sardegna ho l’onore, e non il merito, d’introdurre i lavori di questo Workshop. Il progetto, come noto, è stato finanziato dal MIPAAF in seno agli interventi della legge 194 del 2015 e, in particolare con le risorse del Fondo per la tutela della biodiversità di interesse agricolo e alimentare. L’obiettivo del progetto, per la prima volta in seno alle politiche di tutela della biodiversità, ha avuto come target la conservazione, la tutela e la valorizzazione dell’agrobiodiversità microbica della Sardegna. In questo ambito la nostra Agenzia ha avuto il piacere di collaborare con i Colleghi dei due Atenei sardi di Sassari e Cagliari e con quelli dell’Ospedale San Martino di Genova con i quali tutti mi congratulo, ringraziandoli per l’egregio lavoro svolto. Desidero anche sottolineare il ruolo che la Regione sarda, per il tramite dell’Assessorato dell’Agricoltura e riforma Agropastorale e, in particolare, il Servizio Territorio rurale agroambiente e infrastrutture, ha inteso svolgere promuovendo presso il MIPAAF il finanziamento del progetto e intende continuare a svolgere con le future iniziative per la tutela del patrimonio microbico regionale. Desidero anche ricordare che in Sardegna, sin dal 2014, con l’adozione della Legge regionale n.16 insieme alla tutela delle risorse genetiche d’interesse agrario, zootecnico e forestale, viene introdotta anche l’esigenza della tutela delle specie microbiche, riconoscendone il valore di risorsa locale, protagonista della diversificazione delle produzioni casearie, di salumi, bevande e vari altri prodotti dell’industria alimentare. Vedremo nel corso dei lavori come sia, peraltro, rimarchevole il numero di ceppi collezionati.

Nella certezza dell’altissima qualità del lavoro svolto da tutti i partner del progetto MicroBioDiverSar desidero ringraziare i Colleghi che nell’ambito di Agris, Università di Sassari e Università di Cagliari, per anni si sono impegnati nel garantire la costituzione delle tre fondamentali collezioni microbiche che garantiscono la conservazione della biodiversità microbica della Sardegna e, infine, gli specialisti del laboratorio di bioinformatica dell’Ospedale San Martino di Genova per il ruolo svolto nella progettazione e realizzazione del sito web dedicato.

Auspico che i Colleghi possano proseguire la propria attività su questi importantissimi temi con sempre fecondi risultati e soddisfazioni.

Raffaele Cherchi

Commissario straordinario Agris



Gianni Ibba

Assessorato dell'Agricoltura e Riforma Agro-Pastorale

Regione autonoma della Sardegna

Con la Legge regionale 7 agosto 2014, n.16 Norme in materia di agricoltura e sviluppo rurale: agrobiodiversità, marchio collettivo, distretti, la Regione Sardegna tutela e valorizza il patrimonio di razze e varietà locali, al fine di sostenere lo sviluppo economico e sociale del settore agricolo, di promuovere la tutela degli agroecosistemi, di favorire un utilizzo sostenibile di tali risorse e di garantire la tipicità dei prodotti agricoli nel rispetto delle tradizioni, dei saperi e dei sapori locali.

Rispetto ad altre leggi regionali, la Legge n. 16/2014 introduce la tutela delle risorse genetiche d'interesse agrario, zootecnico e forestale, invitando tutti gli operatori ad avere una visione più organica delle risorse genetiche, dove la valenza prevalentemente economica del termine "risorsa" si unisce agli aspetti ecologici, agronomici, culturali e storici che lo legano al concetto di "territorio".

Non solo, la Legge regionale n. 16 definisce le razze e cultivar locali, come risorse genetiche specificando che si tratta di popolazioni, unità tassonomiche, razze, cultivar, ecotipi, ceppi microbici e cloni autoctoni, originari del territorio della Regione Sardegna e integrati tradizionalmente in forma produttiva nella sua agricoltura, nel suo allevamento e nei processi di trasformazione.

Negli intenti del legislatore, l'inserimento della componente microbica nell'ambito della Legge n. 16, quale ulteriore risorsa genetica da tutelare, oltre quella vegetale ed animale, risulta di fondamentale importanza per il territorio regionale e rappresenta un'occasione unica per la valorizzazione delle tradizioni socioculturali e per l'economia locale.

L'interesse per la tutela dei microrganismi affonda le proprie radici nella tradizione alimentare regionale con la produzione di bevande ed alimenti quali vino, birra, salumi, formaggi e prodotti da forno e intende trasferire la possibilità di sviluppare e innovare tale vasta gamma di prodotti nell'industria degli alimenti anche in chiave salutistica e con forte impatto sulle qualità sensoriali, mantenendo stretto il legame dei prodotti con il territorio.

Gli ambiti di ricerca nei quali la componente microbica trova interesse riguardano non solo il settore agroalimentare ma anche l'ambito sanitario con ricadute sulla salute umana, il contesto ambientale, per esempio con applicazioni su strategie di biorisanamento, lo sviluppo di bioprocessi finalizzati all'ottenimento di composti di natura biogenica di interesse tecnologico (es. nanomateriali) e il settore agronomico, per cui le collezioni di batteri, lieviti e funghi costituiscono un insostituibile strumento per lo sviluppo di metodi di biocontrollo, nell'ottica di un'agricoltura più sostenibile dal punto di vista della compatibilità ambientale.

In tale contesto, la Regione Sardegna si misura e si confronta con le altre politiche regionali e si inserisce nel contesto nazionale coordinato dalla Legge n. 194/2015 recante "Disposizioni per la tutela e la valorizzazione della biodiversità di interesse agricolo e alimentare", attraverso cui il Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali ha costruito un sistema nazionale di tutela e di valorizzazione della biodiversità.

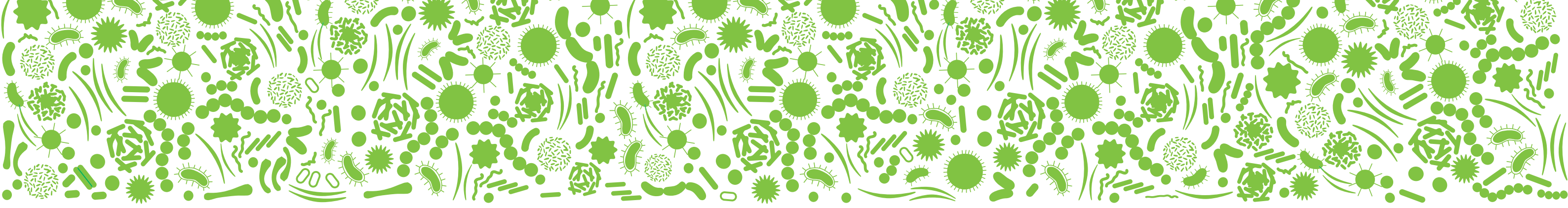
Il sistema nazionale di tutela e di valorizzazione della biodiversità di interesse agricolo e alimentare è costituito:

- a) dall'Anagrafe nazionale della biodiversità di interesse agricolo e alimentare;
- b) dalla Rete nazionale della biodiversità di interesse agricolo e alimentare;
- c) dal Portale nazionale della biodiversità di interesse agricolo e alimentare;
- d) dal Comitato permanente per la biodiversità di interesse agricolo e alimentare.

Un importante strumento volto alla promozione di progetti tesi alla trasmissione delle conoscenze acquisite in materia di biodiversità deriva dal Fondo per la tutela della biodiversità di interesse agricolo e alimentare disposto dall'articolo 10 della Legge 194 del 2015, che concorre al raggiungimento degli obiettivi e dei risultati delle azioni contenute nel Piano nazionale sulla biodiversità.

Il Progetto MicroBiodiverSar, promosso e presentato dall'Assessorato dell'Agricoltura e Riforma Agro-Pastorale, ed elaborato e realizzato dall'Agenzia Agris Sardegna in collaborazione con Uniss, Unica e l'Ospedale S. Martino di Genova, è stato finanziato dal Fondo per la tutela della biodiversità di interesse agricolo e alimentare e ha come obiettivo specifico la conservazione, la tutela e la valorizzazione dell'agrobiodiversità microbica della Sardegna.

Il compito che il Servizio Territorio rurale agroambiente e infrastrutture dell'Assessorato dell'Agricoltura e Riforma Agro-Pastorale della Regione Autonoma della Sardegna, intende perseguire, oltre quello specifico del progetto MicroBiodiverSar relativo ad un primo censimento e catalogazione delle risorse genetiche microbiche a livello regionale, è di avviare un percorso di tutela del patrimonio microbico locale, allo stato attuale carente negli strumenti operativi, teso a creare nel tempo un impatto sempre più consistente sull'economia locale e sulla valorizzazione della tradizione regionale.



Roberta Comunian

Agris Sardegna, Agenzia per la ricerca in agricoltura

Regione autonoma della Sardegna

La biodiversità vegetale, animale e microbica è da tempo oggetto di crescente attenzione a livello globale e, negli ultimi decenni, i governi e le organizzazioni internazionali e regionali si sono dotati di leggi e regolamenti atti a promuoverne la conservazione e la valorizzazione. Tra questi, la Legge 194/2015 “Disposizioni per la tutela e la valorizzazione della biodiversità di interesse agricolo e alimentare” ha dato avvio alla realizzazione di un sistema nazionale, costituito dall’Anagrafe Nazionale, dalla Rete, dal Portale e dal Comitato Permanente, che ha lo scopo di preservare, *in situ* ed *ex situ*, le specie locali (animali, vegetali e microbiche) di interesse agroalimentare a rischio di estinzione o erosione genetica. Tuttavia, la definizione “rischio di estinzione” non è applicabile al concetto di specie microbica e i decreti attuativi della legge non fanno riferimento alla biodiversità microbica, se non per dire che, data la complessità dell’argomento, sarà oggetto di ulteriori decreti attuativi. Pertanto, allo stato attuale, solo le risorse animali e vegetali vengono inserite nei Repertori Regionali e nell’Anagrafe Nazionale mentre la consistenza del patrimonio di risorse microbiche conservate in collezioni *ex situ* da diverse istituzioni italiane è ancora sconosciuta.

In questo contesto, il progetto MicroBioDiverSar (Biodiversità Microbica della Sardegna), finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (Mipaaf) con i fondi della Legge 194/2015, è stato il primo riguardante le risorse microbiche. Lo scopo del progetto è stato quello di censire e catalogare le risorse microbiche presenti in tre collezioni sarde (Agris Sardegna, Università di Sassari e Università di Cagliari) e di costruire un database e un sito web dedicato, affidandone la progettazione e realizzazione al laboratorio di bioinformatica dell’Ospedale Policlinico San Martino di Genova.

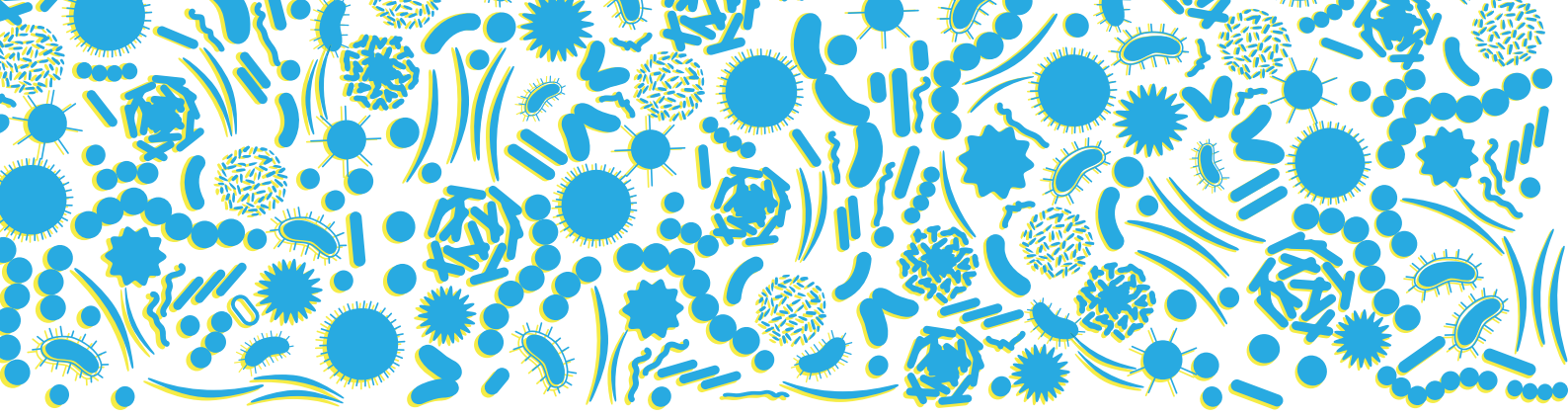
Questi quattro istituti sono anche membri associati o partner della *Joint Research Unit* (JRU) MIRRI-IT (<http://www.mirri-it.it/index.php/>) che sta sviluppando la rete italiana delle collezioni microbiche, con l’obiettivo comune di superare l’attuale frammentazione nella disponibilità di risorse e servizi e valorizzare il sistema di gestione della qualità delle collezioni, concentrandosi sulle esigenze dei soggetti interessati al trasferimento biotecnologico delle risorse. Il database relazionale, realizzato secondo standard internazionali, è lo strumento di gestione delle collezioni partner del progetto e il sito web mira a costituire un importante canale di comunicazione con il mondo imprenditoriale che opera nel settore agroalimentare e con altre istituzioni di ricerca. Inoltre, il database MicroBioDiverSar rappresenta un’occasione di confronto tra le collezioni partner del progetto e altre collezioni italiane, caratterizzate da sistemi più avanzati di gestione e conservazione dei microorganismi.

Per raggiungere l’obiettivo, in un primo momento, per ciascuna collezione, è stata effettuata la raccolta di tutte le informazioni disponibili sul numero di accessioni, specie di appartenenza dei microrganismi, loro origine, anno e luogo di raccolta e modalità di conservazione. Questa fase ha richiesto un’approfondita ricerca documentale negli archivi cartacei degli enti ospitanti le collezioni, poiché le informazioni sugli isolati raccolti per diversi decenni, a partire dagli anni ’60, non erano disponibili in forma digitale, mentre i dati relativi agli isolati più recenti erano stati riportati in tabulati su fogli elettronici, spesso non omogenei per struttura. Inoltre, talvolta, informazioni sullo stesso isolato si trovavano frammentate in file diversi.

Il passo successivo è stato quello di creare un unico foglio elettronico contenente le informazioni su tutti gli isolati di ciascuna collezione, seguendo sia le regole internazionali che le specifiche esigenze interne di ciascun laboratorio. Parallelamente, le risorse microbiche sono state riordinate fisicamente e inventariate, codificando e registrando la loro posizione.

Il lavoro svolto ha messo in evidenza la presenza di una grande ricchezza di risorse microbiche nelle collezioni sarde partner del progetto. Infatti, sono state incluse nel database circa 200 specie di batteri, lieviti e funghi (di cui oltre 150 già disponibili online), corrispondenti a oltre 20.000 isolati (di cui oltre 2.000 già disponibili online) da diverse matrici (latte e prodotti lattiero-caseari di pecora, capra e vacca; colture starter naturali; caglio in pasta; tratto digerente di agnello; olive da tavola e loro salamoie, olio d’oliva; uva, mosto d’uva, vini; birra, grano, orzo, frumento, malto; salsicce di maiale tradizionali, budello e carne; intestino di pesci, mitili), inseriti nelle collezioni nel corso di oltre 50 anni, che saranno accessibili alla comunità scientifica, a scopo di studio e ricerca, e al mondo delle produzioni agroalimentari.

Perché il lavoro svolto grazie al Progetto MicroBioDiverSar continui ad avere un significato e un valore concreto nel tempo, deve essere garantita la possibilità di mantenere e gestire le risorse microbiche ospitate nelle collezioni, attraverso finanziamenti strutturali dedicati. Solo così sarà possibile garantire la sopravvivenza dei microorganismi e la loro conservazione secondo standard di qualità riconosciuti a livello internazionale, necessari perché le collezioni raggiungano lo *status* di biobanche e possano svolgere il ruolo chiave che compete loro, per lo sviluppo delle biotecnologie e della bioeconomia.



La legge 194/2015 “Disposizioni per la Tutela e la Valorizzazione della Biodiversità di Interesse Agricolo e Alimentare”: stato di attuazione

Vincenzo Montalbano

Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

A quasi cinque anni dalla pubblicazione sulla Gazzetta Ufficiale facciamo il punto sullo stato di attuazione della legge 1° dicembre 2015, n. 194 “Disposizioni per la tutela e la valorizzazione della biodiversità di interesse agricolo e alimentare”.

Nata con lo scopo di coordinare a livello centrale gli interventi di tutela della biodiversità di interesse agricolo, la legge 194/2015 stabilisce i principi per l’istituzione di un sistema nazionale finalizzato alla tutela delle risorse genetiche vegetali, animali e microbiche avente un valore effettivo o potenziale per l’alimentazione e per l’agricoltura.

Con l’implementazione della legge 194/2015 si sta costruendo lo scenario comune dell’agrobiodiversità italiana.

Nel 2015 erano state emanate 12 leggi regionali, tutte più o meno incentrate sulla salvaguardia delle risorse genetiche autoctone.

A livello centrale il Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, nel 2008, con la collaborazione delle Regioni e delle Province Autonome, aveva predisposto il Piano Nazionale sulla Biodiversità di interesse Agricolo (PNBA) e nel 2012, in attuazione del progetto di attuazione del Piano, predisposto dal Comitato permanente per le risorse genetiche, sono state redatte le “Linee guida nazionali per la conservazione in-situ, on-farm ed ex-situ, della biodiversità vegetale, animale e microbica di interesse agrario”.

Le Linee guida sono il primo significativo lavoro nel quale si propongono, oltre alle linee operative per la tutela della biodiversità animale e vegetale, anche quelle per la tutela della biodiversità microbica di interesse alimentare e del suolo.

Fatta questa debita premessa vediamo quali sono i punti salienti della legge 194/2015.

La legge contiene diverse disposizioni che il Mipaaf, supportato dal Comitato permanente per la biodiversità di interesse agricolo e alimentare, deve implementare a livello nazionale, altre disposizioni invece devono essere implementate a livello regionale e locale.

L’articolo 3 della legge istituisce l’Anagrafe nazionale della biodiversità di interesse agricolo e alimentare. L’Anagrafe è uno strumento che raccoglie tutte le informazioni esistenti sulle risorse genetiche di interesse agricolo e alimentare a rischio di estinzione o erosione genetica, coltivate,

allevate e mantenute a livello locale. Per legge in un primo momento entrano a far parte dell’Anagrafe nazionale le specie, le varietà o le razze già iscritte nei repertori o nei registri delle Regioni e delle Province autonome di Trento e di Bolzano.

La legge, però, oltre ad aver istituito l’Anagrafe, all’articolo 17 chiede al Ministero di redigere un decreto sulle modalità di funzionamento della stessa. Tale decreto è stato emanato nel 2018 (Decreto n. 1862 del 18 gennaio 2018). Il decreto difatti disciplina solo le modalità di iscrizione delle risorse genetiche vegetali ed animali, infatti al comma 1 dell’articolo 7 “Disposizioni transitorie” è previsto che le risorse genetiche microbiche saranno oggetto di successivo decreto ministeriale.

Attualmente all’Anagrafe, che non ha ancora una struttura informatica, risultano iscritte 1.887 risorse genetiche vegetali e 107 animali relative ad 8 Regioni.

Questi dati derivano dalla prima “importazione” delle informazioni contenute nei repertori e nei registri regionali e per richieste di nuove iscrizioni da parte di alcune Regioni.

Difficoltà si stanno riscontrando nella realizzazione della Rete nazionale della biodiversità di interesse agricolo e alimentare, di cui all’articolo 4 della legge, che deve essere costituita dagli Agricoltori e Allevatori custodi (AAC) nonché dai Centri di conservazione ex situ e/o Banche del germoplasma (CCES/BG).

Anche per la Rete, la legge 194 all’articolo 17, chiede al Ministero di redigere un decreto sulle modalità tecniche di attuazione della Rete nazionale. In attuazione della legge, il 24 ottobre 2018, è stato emanato il decreto n. 10400 che disciplina le “Modalità tecniche di attuazione della Rete nazionale della biodiversità di interesse agricolo e alimentare”.

Anche questo decreto in coerenza con quanto stabilito all’articolo 7, comma 1, del decreto del Ministro delle politiche agricole alimentari e forestali, 18 gennaio 2018, n. 1862, stabilisce che i requisiti e criteri di individuazione dei soggetti custodi e dei Centri di conservazione ex situ/Banche del germoplasma (CCES/BG) delle risorse genetiche microbiche saranno oggetto di un successivo decreto ministeriale.

A seguito dell’emanazione del decreto n. 10400, il Mipaaf nel 2019 ha chiesto alle Regioni e alle Province autonome di Trento e di Bolzano di trasmettere l’elenco degli Agricoltori e Allevatori custodi (AAC) riconosciuti formalmente secondo quanto riportato al punto 6, allegato 2 allo stesso decreto. Purtroppo, si sono riscontrati problemi per quel che riguarda l’informazione e la trasmissione dei dati sensibili per cui molte Regioni hanno avuto qualche difficoltà nel trasmettere i dati richiesti. Si è constatato, inoltre, che c’è poca chiarezza ed uniformità nella definizione di Agricoltori e Allevatori Custodi nelle varie norme regionali e nelle varie misure dei PSR. Tra l’altro alla Rete possono essere iscritti soltanto agricoltori e allevatori che conservano risorse genetiche locali a rischio di estinzione o di erosione genetica, iscritte nell’Anagrafe nazionale.

Per quanto riguarda i Centri di conservazione ex situ e/o Banche del germoplasma (CCES/BG) il Mipaaf, nei prossimi mesi, ha in programma di chiedere alle Regioni l’invio delle informazioni sui Centri di conservazione che conservano risorse genetiche di interesse alimentare ed agrario locali a rischio di estinzione o di erosione genetica ed iscritte nell’Anagrafe nazionale.

Il Portale, di cui all’articolo 5 della legge, è in fase di costruzione. Conterrà oltre la sezione dell’Anagrafe, informazioni su tutto ciò che riguarda l’agrobiodiversità; pensiamo alle varie leggi regionali, alla Rete nazionale, alle Comunità del cibo, agli itinerari, alla Giornata nazionale della biodiversità di interesse agricolo e alimentare ecc. Sarà un portale attivo e dinamico.

La legge 194/2015, all’articolo 7 parla del Piano nazionale sulla biodiversità di interesse

agricolo e delle Linee guida nazionali per la conservazione in situ, on farm ed ex situ della biodiversità vegetale, animale e microbica di interesse agrario. Richiamando questi documenti il legislatore riconosce l'importanza che gli stessi hanno per la salvaguardia dell'agrobiodiversità. Al fine di dare una validità ed efficacia ai due strumenti, il legislatore chiede che siano effettuati aggiornamenti periodici.

Il Ministero, sentito il Comitato permanente per la biodiversità di interesse agricolo e alimentare, di cui all'articolo 8 della legge 194/2015, a breve dovrebbe avviare l'aggiornamento del primo strumento: il Piano.

L'aggiornamento del Piano sarà affidato ad un gruppo di lavoro di cui faranno parte i componenti del Comitato permanente per la biodiversità di interesse agricolo e alimentare e gli esperti che saranno designati dalla Conferenza delle Regioni.

Le Linee guida saranno aggiornate dopo aver verificato il livello implementazione da parte delle Regioni e dalle Province autonome di Trento e di Bolzano nonché i progressi ottenuti con l'attuazione delle stesse.

Per quanto riguarda il Fondo, di cui all'articolo 10, pari a 500.000,00 euro l'anno, le risorse disponibili sono state impegnate con due provvedimenti.

Nel 2017 le somme provenienti dalle annualità 2015/2016 sono state assegnate alle Regioni come da intesa in sede di Conferenza Stato-Regioni nel corso della seduta del 22 dicembre 2016.

Le risorse 2017 sono state assegnate attraverso la pubblicazione di un avviso pubblico a cui hanno potuto partecipare le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano.

Nella giornata di oggi vengono presentati i risultati del progetto MicroBiodiverSar finanziato con i fondi 2015 e 2016. Questo progetto che ha l'obiettivo di creare un sistema standardizzato di conservazione gestione, tutela e valorizzazione della biodiversità microbica della Sardegna, farà da apripista per questo specifico settore dell'agrobiodiversità. Aspettiamo fiduciosi i risultati del progetto per iniziare a discutere con i componenti del Comitato come disciplinare le risorse microbiche di interesse agricolo e alimentare.

Poi c'è tutta la parte che dovrà essere realizzata a livello locale. Sugli itinerari della biodiversità siamo a conoscenza di diverse iniziative locali come pure sulle Comunità del cibo.

Come Ministero siamo molto soddisfatti nel vedere che a livello locale, gruppi di agricoltori e allevatori, portatori di interessi, enti, ristoratori, riescono a costruire questi sistemi.

Siamo convinti che la norma nazionale, implementata e utilizzata nel suo complesso, potrà dare nel prossimo futuro quei prodotti che la GDO non riuscirà mai a dare: tipicità, tradizioni, cultura e genuinità.

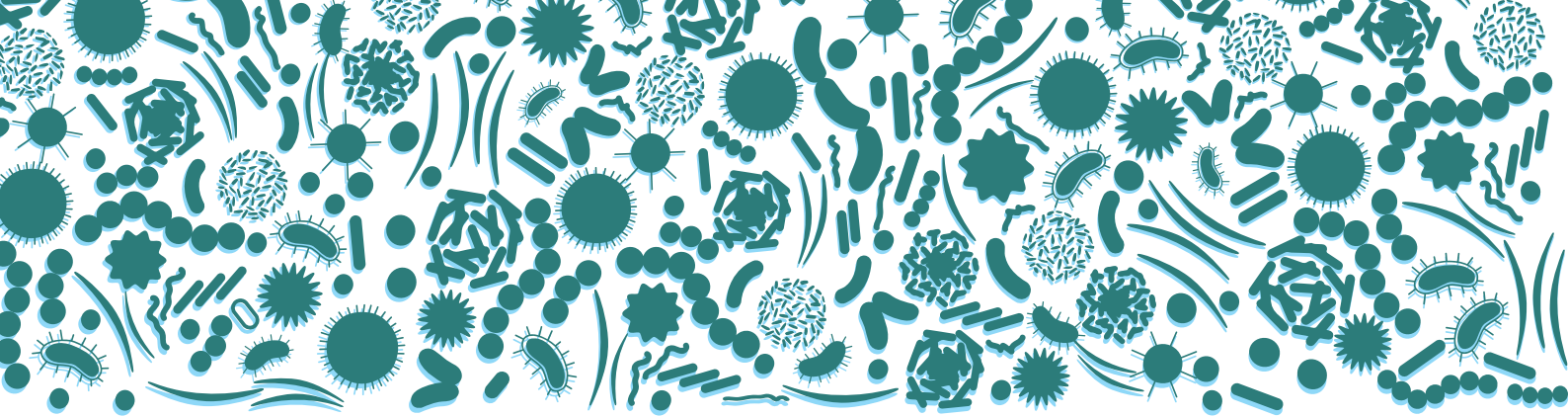
La Giornata della biodiversità di interesse agricolo e alimentare, ormai entrata a far parte del programma di ogni Regione e Provincia autonoma, rappresenta un momento unico e speciale per tutti gli attori che partecipano alla tutela e alla valorizzazione della biodiversità di interesse agricolo e alimentare. Durante la giornata, grazie anche alle risorse messe a disposizione con l'articolo 10 della legge 194/2015, vengono organizzati iniziative, incontri e seminari dedicati alla biodiversità agricola e alle modalità di tutela e di conservazione del patrimonio esistente.

I prossimi passi che intendiamo fare sono:

- ✓ l'inserimento nell'Anagrafe nazionale delle razze iscritte nei libri genealogici e nei registri anagrafici;
- ✓ l'aggiornamento del Piano Nazionale sulla Biodiversità di interesse Agricolo (PNBA);

- ✓ realizzazione di un marchio.

Abbiamo la consapevolezza che il lavoro da fare è tanto ma abbiamo anche l'ambizione di credere nelle potenzialità dell'agrobiodiversità e dei territori rurali. Abbiamo il dovere di preservare le risorse genetiche di interesse alimentare ed agrario. Lo dobbiamo fare. Abbiamo un dovere nei confronti delle generazioni future.



La tutela della agrobiodiversità in Sardegna e le proposte di modifica della Legge regionale n. 16/2014

Antonella Rocchi

Assessorato dell'agricoltura e riforma agro-pastorale, Regione Sardegna

1. L'attuazione della Legge regionale 8 agosto 2014, n. 16 - “Norme in materia di agricoltura e sviluppo rurale: agrobiodiversità, marchio collettivo, distretti”

Con la Legge regionale 7 agosto 2014, n.16 - Norme in materia di agricoltura e sviluppo rurale: agrobiodiversità, marchio collettivo, distretti - la Regione Autonoma della Sardegna riconosce e tutela l'agrobiodiversità del proprio territorio sotto il profilo economico, scientifico, culturale ed ambientale.

In particolare, la Legge regionale prevede misure di tutela e valorizzazione delle risorse genetiche locali al fine di sostenere lo sviluppo economico e sociale del settore agricolo, promuovere la tutela degli agroecosistemi, favorire l'utilizzo sostenibile di tali risorse, garantire la tipicità dei prodotti agricoli nel rispetto di tradizioni, saperi e sapori locali.

2. Gli strumenti previsti dalla Legge regionale n. 16/2014. Stato dell'arte e sviluppi.

I principali strumenti che la Legge regionale n. 16/2014 ha istituito per la tutela dell'Agrobiodiversità sono:

- Il Repertorio regionale delle risorse genetiche animali e vegetali (artt. 4-5)
- La Banca regionale del Germoplasma per l'agricoltura e l'alimentazione (art. 7)
- Gli Agricoltori - Allevatori Custodi (art. 10)
- La Rete di conservazione e sicurezza delle risorse genetiche (art. 8)
- La Comunità di tutela della biodiversità agraria, della cultura, qualità e sicurezza alimentare

Inoltre, la Legge regionale prevede l'istituzione, attraverso Delibera della Giunta Regionale, della Commissione Tecnico Scientifica e del suo Comitato di Coordinamento per assolvere a tutte quelle funzioni operative relative all'individuazione e tutela delle risorse genetiche autoctone e a rischio di erosione o estinzione genetica.

La gestione di tali strumenti è stata affidata alle due Agenzie regionali Agris Sardegna e Laore Sardegna che, con ruoli autonomi e ciascuna con competenze specifiche, collaborano insieme per la realizzazione delle attività.

Tabella 1 - Agenzie coinvolte nell'attuazione della Legge regionale 16/2014.

STRUMENTI	Agenzie
Repertorio regionale delle risorse genetiche animali e vegetali	Laore
Banca regionale del Germoplasma per l'agricoltura e l'alimentazione	Agris
Agricoltori - Allevatori Custodi	Laore
Rete di conservazione e sicurezza delle risorse genetiche	Laore
Comunità di tutela della biodiversità agraria, della cultura, qualità e sicurezza alimentare	Laore

Nella previsione degli strumenti operativi, la Legge regionale n. 16/2014, ha tralasciato, però, la componente microbica. Anche le Direttive di attuazione hanno seguito questa strada mettendo in evidenza le lacune originarie della Legge regionale. Questo aspetto deriva certamente dalla carenza di indicazioni o linee guida condivise in ambito nazionale ed internazionale relativamente all'interpretazione dell'estensione del concetto di “rischio di estinzione ed erosione genetica” alle specie microbiche.

Il Servizio Territorio rurale agroambiente e infrastrutture dell'Assessorato dell'Agricoltura e Riforma Agro-Pastorale della Regione Autonoma della Sardegna sta provvedendo a colmare questa lacuna attraverso la presentazione di un Disegno Legge che si propone come principale obiettivo il perfezionamento del testo includendo la componente microbica quale parte integrante delle risorse genetiche locali e del patrimonio da tutelare e valorizzare.

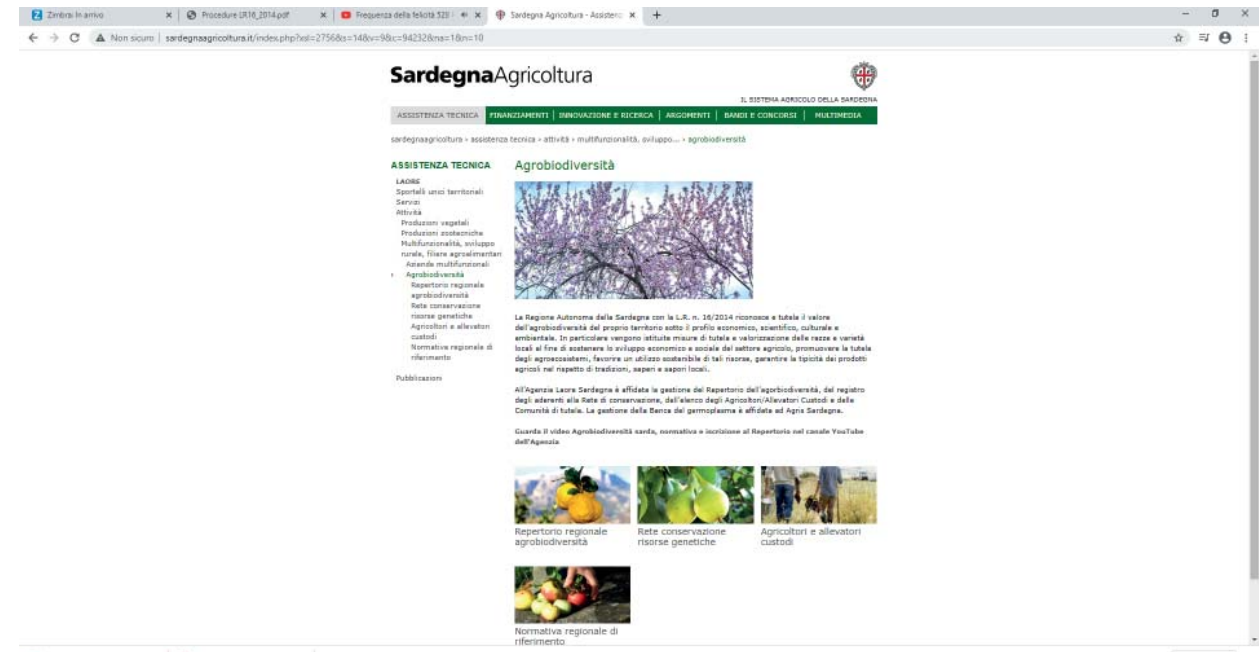


Figura 1 - <http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=2756&s=14&v=9&c=94232&na=1&n=10>

L'obiettivo è, quindi, ampliare le funzioni delle strutture deputate ad assolvere al compito della tutela, della conservazione e della valorizzazione delle risorse genetiche attraverso l'inserimento e l'estensione della componente microbica.

Il Repertorio regionale

Il Repertorio regionale è un registro nel quale vengono iscritte le risorse genetiche autoctone e quelle a rischio di erosione genetica o estinzione.

Al Repertorio regionale vengono iscritte:

- di diritto:
 - le risorse genetiche vegetali già iscritte nel Registro Nazionale delle varietà da conservazione e le risorse genetiche animali già iscritte nei Registri Anagrafici Nazionali o nei Libri Genealogici
- su domanda:
 - le varietà e razze autoctone originarie della Sardegna;
 - le risorse genetiche animali e vegetali introdotte da lungo tempo nel territorio della Regione e integrate tradizionalmente in forma produttiva nella sua agricoltura, nel suo allevamento e nei processi di trasformazione;
 - le risorse genetiche animali e vegetali allevate, coltivate o depositate presso banche del germoplasma presenti nel territorio regionale e extraregionale per le quali sia possibile dimostrare la provenienza dal territorio.

Con il Disegno di Legge che propone la modifica della Legge regionale n. 16/2014 il Servizio Territorio rurale agroambiente e infrastrutture propone l'istituzione del Repertorio delle risorse genetiche microbiche. Tale Repertorio si avvarrà dei risultati scientifici raggiunti attraverso la realizzazione del progetto MicroBioDiverSar e, in particolare, utilizzerà le modalità di catalogazione e gestione delle informazioni adottate nella realizzazione del database relazionale interoperativo, progettato per le collezioni microbiche della Sardegna dal laboratorio di bioinformatica dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova, in linea con standard condivisi a livello europeo.

La Banca regionale del germoplasma

La Banca regionale del germoplasma è il luogo fisico nell'ambito del quale confluiscano i campioni di materiale genetico di tutte le accessioni iscritte nei Repertori regionali e svolge tutte le operazioni dirette a salvaguardare il materiale in essa conservato da qualsiasi forma di contaminazione, alterazione e distruzione, garantendone la disponibilità nel tempo.

La Banca del germoplasma regola l'accesso al materiale genetico attraverso la sottoscrizione di accordi con i soggetti interessati relativamente ai limiti di utilizzazione del materiale genetico, tenuto conto di quanto previsto dal Trattato internazionale sulle risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura adottato dalla Food and Agriculture Organization (FAO) il 3 novembre 2001, dei successivi

atti internazionali in materia e dalla normativa nazionale vigente (Legge n. 194 /2015).

Con il Disegno di Legge di modifica alla Legge regionale 16/2014 si propone di estendere la tutela ex situ a tutte le risorse genetiche autoctone, quindi, oltretutto alle razze e varietà locali anche ai ceppi microbici.

Gli Agricoltori e Allevatori Custodi

Gli Agricoltori - Allevatori sono soggetti privati, in forma singola o associata, operanti e ubicati nel territorio regionale, proprietari di terreno agricolo o forestale o che ne siano detentori sulla base di titolo valido alla data della richiesta, in possesso di risorse di cui all'art. 4, comma 3, della Legge regionale 16/2014 e in possesso di specifica esperienza o capacità professionale.

L'Agricoltore - Allevatore custode svolge un ruolo di importanza fondamentale nella conservazione ex situ della risorsa genetica e nella sua tutela al fine di ridurre la possibilità di deperimento anche accidentale, del materiale genetico conservato.

All'Agricoltore e Allevatore custode può venir conferito un incarico nel caso in cui la Commissione Tecnico Scientifica ritenga necessario un intervento di conservazione e tutela per una specifica risorsa. In tal caso l'Agricoltore - Allevatore custode si impegna a custodire e tutelare la risorsa, a non rivendicare diritti di proprietà intellettuale sul materiale genetico, ad accettare le condizioni di accesso ai luoghi in cui egli svolge la propria attività a fini di verifica e controllo da parte del personale delle Agenzie Laore e Agris o di soggetti da esse incaricati. Si impegna, inoltre, ad accettare le condizioni di cessione a titolo gratuito del materiale di riproduzione e di propagazione di cui sia in possesso, verso gli aderenti alla Rete che facciano richiesta.

Con la proposta di modifica alla Legge regionale 16/2014 si intende introdurre, affianco all'Agricoltore - Allevatore custode, la figura del Produttore custode il quale, attraverso l'utilizzo in produzione, riproduce e si impegna a mantenere vitali nell'ambiente le risorse genetiche microbiche.

La Rete di conservazione e sicurezza delle risorse genetiche di interesse agrario, zootecnico e forestale

La Rete di conservazione e sicurezza delle risorse genetiche svolge ogni attività diretta a mantenere in vita il patrimonio di interesse agrario, zootecnico e forestale minacciato da erosione genetica attraverso la conservazione ex situ e in situ e provvede ad agevolarne la circolazione.

Della Rete fanno parte di diritto gli Agricoltori - Allevatori custodi e la Banca regionale del germoplasma per l'agricoltura e l'alimentazione. Alla Rete possono aderire altri soggetti pubblici o privati, quali enti locali, istituti sperimentali, centri di ricerca, università, associazioni, comitati per le biodiversità, agricoltori e produttori, singoli o in forma associata, con l'impegno di fornire alla

Banca del germoplasma una parte del materiale vivente ai fini della moltiplicazione, per garantire la conservazione delle informazioni genetiche presso altro sito accreditato.

Alla Rete di conservazione e sicurezza delle risorse genetiche della biodiversità agraria, che rappresentano i soggetti del territorio interessati e coinvolti nelle azioni di custodia, tutela e valorizzazione della biodiversità locale, saranno integrati mediante gli emendamenti alla Legge regionale n. 16/2014 tutti i soggetti che parteciperanno alle stesse azioni di tutela delle risorse microbiche.

Le Comunità di tutela della biodiversità agraria, della cultura, qualità e sicurezza alimentare

Le Comunità di tutela della biodiversità rappresentano gli ambiti locali derivanti da accordi tra Agricoltori - Allevatori custodi, comitati per la biodiversità, gruppi di acquisto solidali, istituti scolastici e universitari, centri di ricerca, associazioni per la tutela della qualità della biodiversità agraria e alimentare, ospedali, esercizi di ristorazione, esercizi commerciali, piccole e medie imprese artigiane di trasformazione agraria e alimentare, nonché enti pubblici.

Promuovono comportamenti atti a tutelare la biodiversità agraria e alimentare anche con la collaborazione delle camere di commercio, dei consorzi di tutela, delle organizzazioni agricole di categoria maggiormente rappresentative e di altri soggetti riconosciuti, pubblici o privati.

Gli accordi tra i soggetti aderenti alla Rete possono avere come oggetto:

- lo studio, il recupero e la trasmissione di conoscenze su varietà e razze locali;
- lo studio e la diffusione di pratiche proprie dell'agricoltura biologica e di altri sistemi colturali a basso impatto ambientale e volti al risparmio idrico, alla minore emissione di anidride carbonica, alla maggiore fertilità dei suoli e al minore utilizzo di imballaggi per la distribuzione e per la vendita dei prodotti;
- la realizzazione di forme di filiera corta, di vendita diretta, di scambio e di acquisto di prodotti agricoli e alimentari nei circuiti locali in ambito regionale;
- la costituzione dei distretti;

lo studio, il recupero e la trasmissione dei saperi e sapori locali relativi alle pratiche agricole tradizionali e identitarie delle colture agrarie e degli allevamenti.

Con le proposte di emendamenti alla Legge regionale n. 16/2014 alla Rete di tutela della biodiversità agraria, della cultura, qualità e sicurezza alimentare parteciperanno tutti i soggetti interessati e coinvolti nella tutela delle risorse microbiche.

La Commissione Tecnico Scientifica per l'agrobiodiversità animale e vegetale

La Commissione Tecnico Scientifica è un organismo, i cui componenti sono nominati dalla Giunta regionale, deputato a svolgere le seguenti funzioni:

- esprimere pareri in merito all'iscrizione e alla cancellazione della varietà da conservazione nel repertorio regionale del patrimonio genetico;
- stabilire l'urgenza, la priorità e la tipologia d'intervento per ciascuna delle varietà da conservazione;
- proporre i criteri per l'individuazione degli Agricoltori - Allevatori custodi delle varietà da conservazione;
- esprimere pareri in merito alle richieste di prelievo di materiale di risorse genetiche di cui all'articolo 1, finalizzato al miglioramento genetico o all'ottenimento di prodotti che incorporano il materiale o qualsiasi delle sue parti o componenti genetiche e per cui si intende inoltrare richiesta di privativa.

Con la proposta di modifica alla Legge regionale 16/2014 si intende allargare la composizione della Commissione Tecnico Scientifica con esponenti di rilievo in materia di risorse microbiche e ampliare le competenze della stessa in ambito di risorse genetiche microbiche.

3. Primi passi verso la tutela della microbiodiversità con il Progetto MicroBioDiverSar

I primi passi verso la tutela della microbiodiversità si avviano, certamente, dalla modifica della Legge regionale n.16/2014. Contemporaneamente, il Servizio Territorio rurale agroambiente e infrastrutture sta operando concretamente attraverso ulteriori strumenti che vedono la realizzazione di progetti pilota volti a realizzare i primi step per la salvaguardia delle risorse microbiche autoctone.

Il primo di questi interventi è il progetto MicroBioDiversar, finanziato attraverso il Fondo della Legge nazionale 194 del 2015. MicroBioDiversar, rappresenta una prima occasione per codificare il processo di tutela e gestione delle risorse genetiche microbiche attraverso la costruzione del database delle collezioni microbiche della Sardegna, realizzato secondo standard internazionali.

I risultati di MicroBioDiversar potranno costituire un valido strumento utilizzabile anche dalle altre Regioni italiane e a livello nazionale per avviare questo importante percorso di sostegno della microbiodiversità.



La storia, l'organizzazione e le possibili applicazioni delle collezioni microbiche della Sardegna

- La collezione Agris BNSS
- La collezione UNISS
- La collezione UNICA

LA COLLEZIONE AGRIS BNSS

Elisabetta Daga, Antonio Paba, Ilaria Dupré, Rosanna Floris, Luigi Chessa, Roberta Comunian

Agris Sardegna, Agenzia per la ricerca in agricoltura

1. La collezione BNSS: una storia che ha compiuto 50 anni



Figura 1 - Vecchi quaderni di laboratorio

Tra le attività storiche del programma scientifico del Settore Microbiologia di Agris Sardegna vi è la costituzione ed il mantenimento di una collezione microbica. La collezione batterica BNSS

(Bonassai, Sassari), parte della quale è ora inclusa tra le collezioni sarde MBDS, istituita col progetto MicroBioDiverSar, è stata fondata nel 1967 dal Dr. Severino Arrizza e dal Dr. Antonio Ledda, presso l'Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna di Bonassai (Sassari). L'acquisizione del materiale biologico è avvenuta negli anni attraverso l'isolamento di microrganismi da diverse matrici, principalmente prodotti agroalimentari DOP e tradizionali della Regione Sardegna.

Il primo nucleo di isolati deriva da studi sull'impiego di colture starter naturali nella produzione del Pecorino Romano, per migliorarne la qualità e ridurre gli scarti. In quegli anni alcune colture naturali (*scotta-innesto*) sono state liofilizzate *in toto*, rendendo possibile la conservazione di ceppi autoctoni, prima del massiccio uso di innesti selezionati.

La collezione si è poi arricchita negli anni grazie anche a progetti finalizzati, finanziati a livello regionale, nazionale e internazionale da Regione Sardegna, Mipaaf, Unione Europea.

Il mantenimento di una collezione microbica comporta la gestione di due tipologie di risorse: documentali e biologiche. La preservazione della diversità microbica legata alla ricerca spesso è focalizzata sulla conservazione del materiale biologico; tuttavia non meno importanti sono le relative informazioni raccolte e i risultati dei lavori sperimentali riportati negli articoli scientifici.

Il riordino della collezione ha comportato un impegnativo e importante lavoro di censimento e catalogazione del materiale documentale relativo agli isolati, necessario per ricostruirne la storia dispersa nei quaderni di laboratorio delle persone che avevano lavorato negli anni ai vari progetti (Figura 1). Sono stati inoltre recuperati vecchi tabulati cartacei e informatici in formato Excel (post 1997) e altri formati più vecchi. Tali file presentavano spesso strutture disomogenee o dati duplicati: è stato pertanto necessario controllare e integrare le informazioni sugli stessi isolati, eliminando i doppioni, e successivamente formattare i file secondo la struttura da importare nel database di gestione. Le informazioni ritrovate nei quaderni hanno spesso consentito il completamento dei dati inseriti nei fogli elettronici.

I quaderni di laboratorio sono stati raccolti, catalogati su un foglio elettronico considerando l'anno, l'argomento, il progetto e l'autore del quaderno, indicizzati con un codice alfanumerico e riordinati fisicamente in uno schedario, secondo il numero progressivo attribuito.

Contemporaneamente al riordino documentale è stato fatto il censimento e controllo delle provette contenenti le colture crioconservate e liofilizzate (Figura 2).



Figura 2 - Isolati conservati negli ultrafreezer -80°C e nell'armadio a cassettei dei liofilizzati

Per sicurezza, diverse copie degli stessi isolati sono state conservate in congelatori distinti. Ogni scatola è stata codificata con una sigla alfanumerica in cui sono inclusi il numero della stanza, l'ultrafreezer, lo scomparto, il rack, e la posizione scatola nel rack: questo codice è stato riportato nel catalogo di gestione interna per consentire la veloce individuazione della posizione dell'isolato. Oltre agli isolati congelati, sono stati riordinati e inseriti nel database anche gli isolati di cui esistono solo copie liofilizzate, precedentemente registrati solo in uno schedario cartaceo.

2. Descrizione collezione BNSS

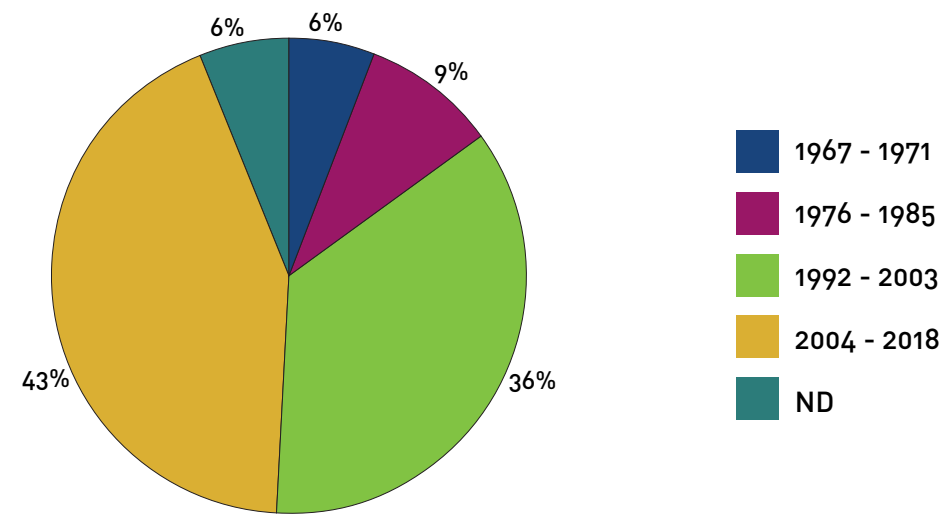


Figura 3 - Distribuzione degli isolati in base al periodo di isolamento

La collezione attuale è composta da 21.180 isolati, la cui distribuzione in base ai periodi di isolamento è indicata nella Figura 3. Per un certo numero di isolati (ND nel grafico) non è stato possibile risalire con precisione al periodo di isolamento, perché non era stato riportato nei documenti cartacei, tuttavia questi possono essere ricondotti agli anni '70-'80.

Dei 21.180 isolati, 8.055 sono in coltura pura e 5.762 (72%) sono stati identificati a livello di genere e specie e con metodi molecolari quali PCR specie-specifica, ARDRA, REP-(GTG)₅, sequenziamento del 16SrRNA.

Tra gli isolati identificati, 1.794 sono stati inclusi nel catalogo disponibile sul sito web del progetto per gli stakeholder appartenenti al mondo produttivo o scientifico.

Le più frequenti matrici di provenienza sono rappresentate da prodotti alimentari, per la maggior parte di origine animale (Figura 4), ma, negli ultimi anni, sono stati investigati anche alimenti vegetali; una quota inferiore di isolati ha invece origine animale (apparato gastro-intestinale di agnelli, feci ovine, intestino di pesci). Le matrici di isolamento sono rappresentate da formaggi di pecora e di capra, innesti naturali, salsiccia, lattici fermentati, latte di pecora, olive fermentate (Figura 4). Si tratta prevalentemente di prodotti DOP o tradizionali: Pecorino Romano DOP, Fiore Sardo DOP, Pecorino sardo DOP, altri formaggi pecorini, Casu axedu, Fresa, Gioddu, Salsiccia artigianale a fermentazione naturale, olive da mensa in salamoia.

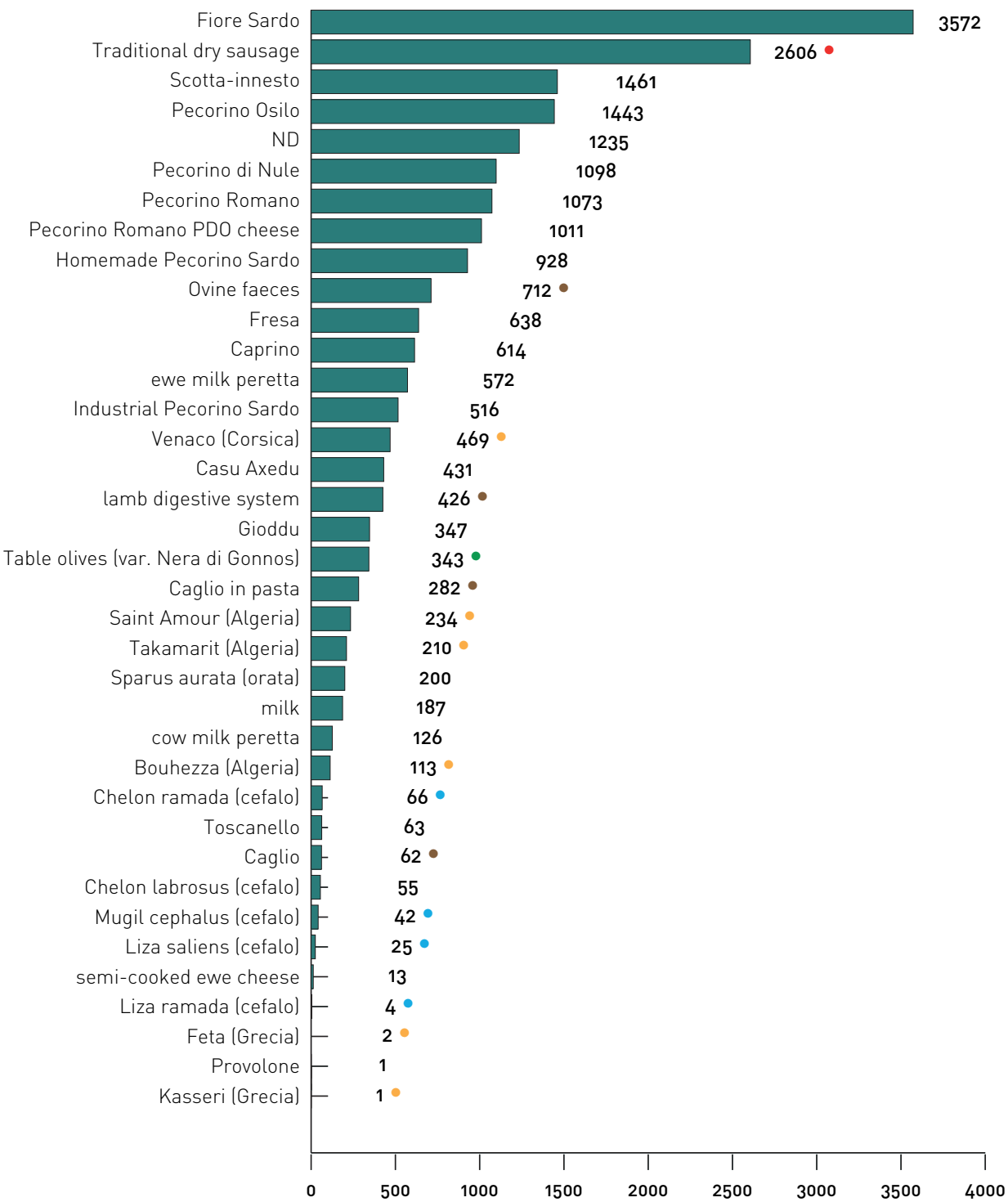
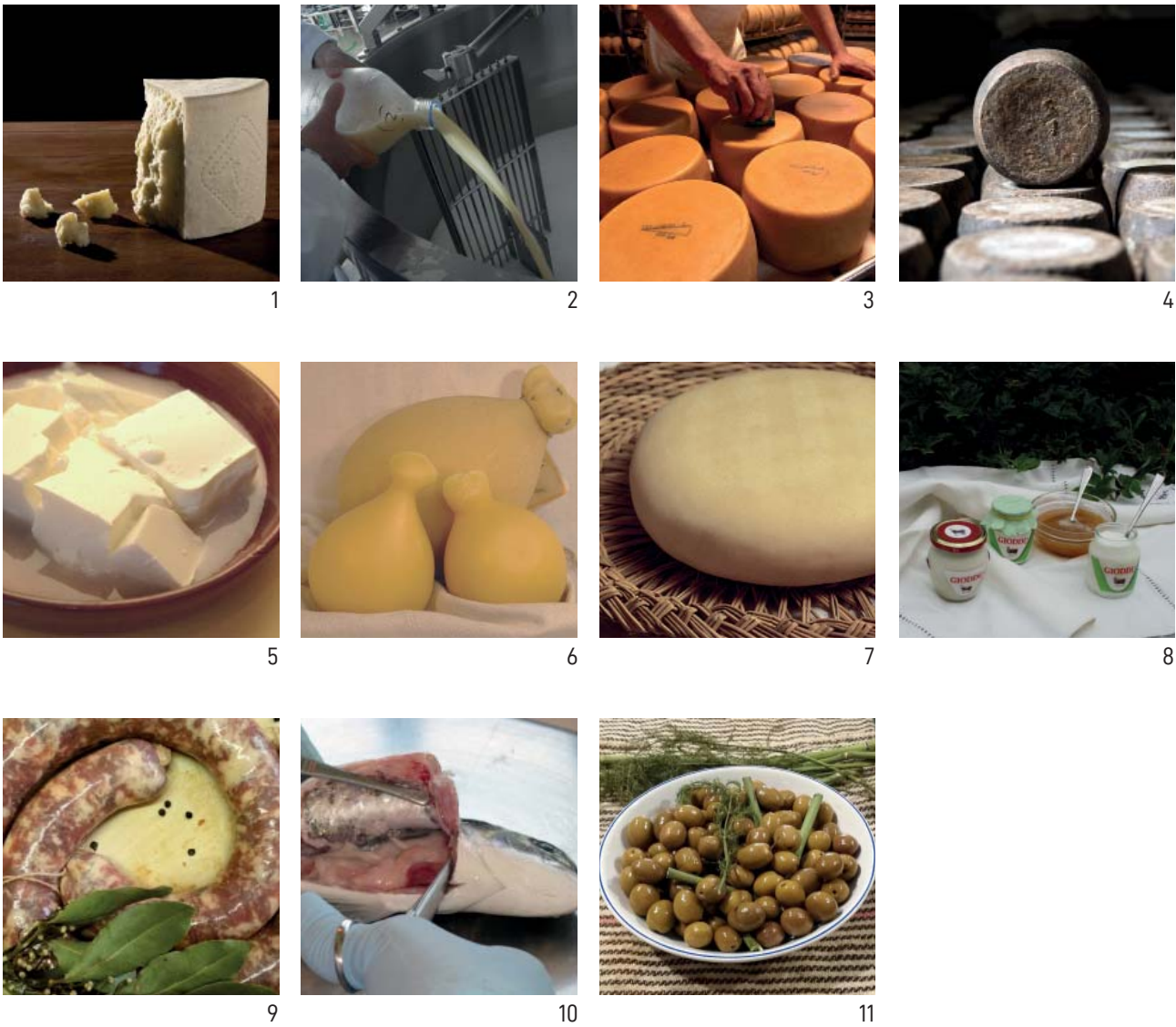


Figura 4 - Distribuzione degli isolati in base alla matrice d'origine

Per facilitare la lettura del grafico nell'individuazione della provenienza degli isolati, in figura 4, gli isolati autoctoni di origine non casearia sono stati evidenziati con diversi colori: ● per gli isolati ittici, ● per quelli da Salsiccia, ● per quelli di origine animale, ● per le olive da mensa. Con il ● sono evidenziati gli isolati provenienti da paesi stranieri.



Alcune delle matrici di origine degli isolati:
1. Pecorino Romano DOP fonte Consorzio di tutela Pecorino Romano, 2. scotta innesto- fonte Agris,
3. Pecorino Sardo DOP fonte Laore, 4. Fiore_sardo_dop21 Fonte Consorzio Fiore Sardo, 5. Casu axedu fonte Laore,
6. Peretta fonte Laore, 7. Fresa fonte Laore, 8. Gioddu Fonte Agris, 9. Salsiccia sarda artigianale fonte Laore,
10. Intestino pesce Fonte Agris, 11. Olive da mensa Fonte Laore

I 5.762 isolati identificati sono distribuiti in 34 generi e 59 specie (Figura 5). Il più rappresentato è il genere *Enterococcus*, 1.788 isolati, per la maggior parte provenienti da formaggi a latte crudo o termizzato. Altri generi fortemente rappresentati sono *Lactiplantibacillus* (978) e *Lacticaseibacillus* (580), isolati prevalentemente da formaggio a latte crudo; batteri costituenti il microbiota starter nelle produzioni casearie quali *Lactobacillus* (746), *Streptococcus* (374) e *Lactococcus* (428); *Latilactobacillus* (359) e *Staphylococcus* (257) tra i quali vengono annoverate specie costituenti il microbiota batterico dei salumi a fermentazione naturale.
I 1.794 isolati della collezione BNSS inseriti nel catalogo regionale appartengono a 45 specie. Le specie più rappresentate sono: *Enterococcus faecium*, *Lactiplantibacillus plantarum*,

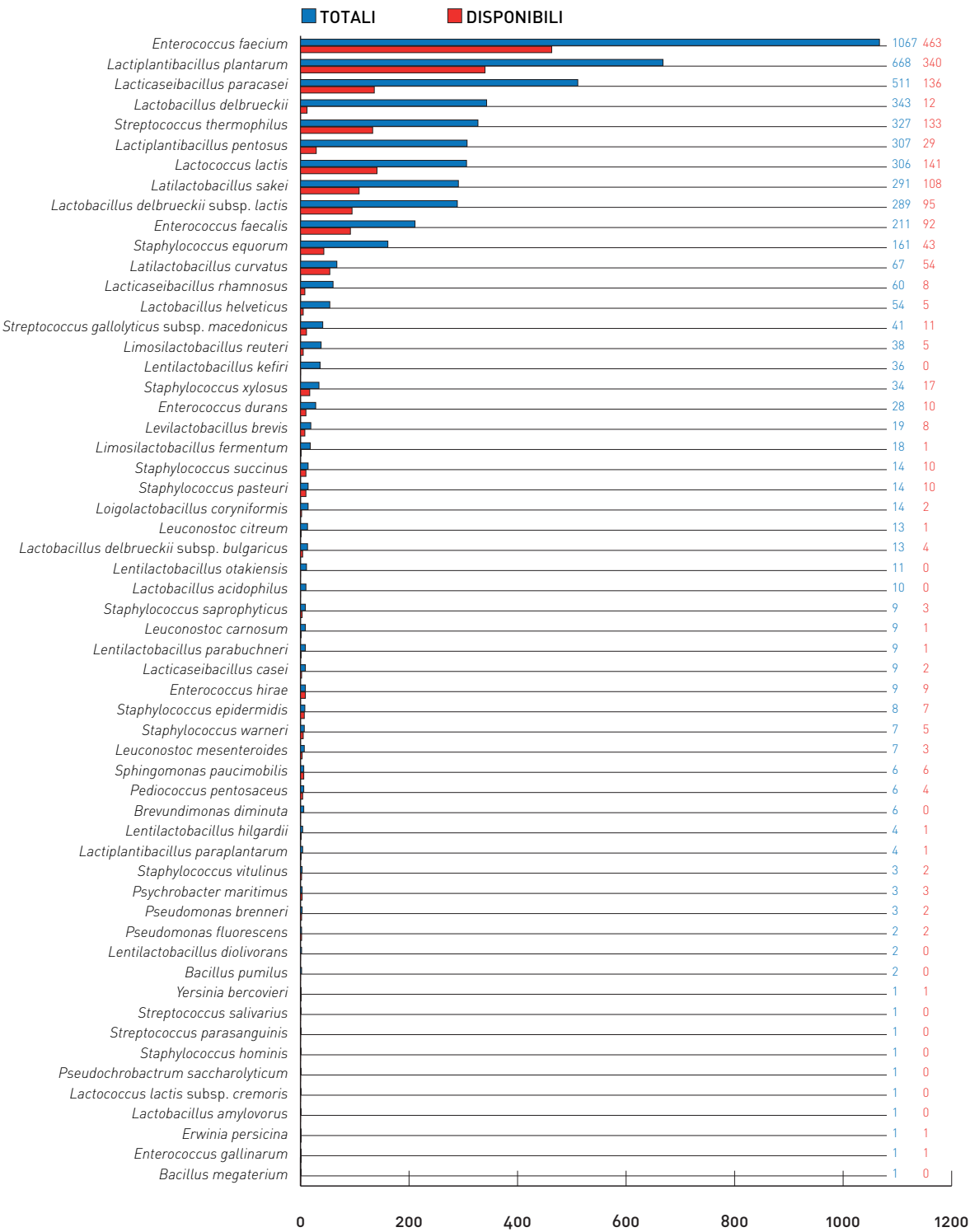


Figura 5 - Distribuzione isolati per specie. Il numero è riferito agli isolati disponibili

Lacticaseibacillus paracasei, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Latilactobacillus sakei*, *Enterococcus faecalis*, *Latilactobacillus curvatus* e *Staphylococcus equorum*.
La specie più rappresentata, *Enterococcus faecium*, è stata isolata da numerose matrici quali Fiore Sardo, Pecorino Sardo artigianale, Pecorino Romano, Casu axedu, scotta-innesto e feci ovine.

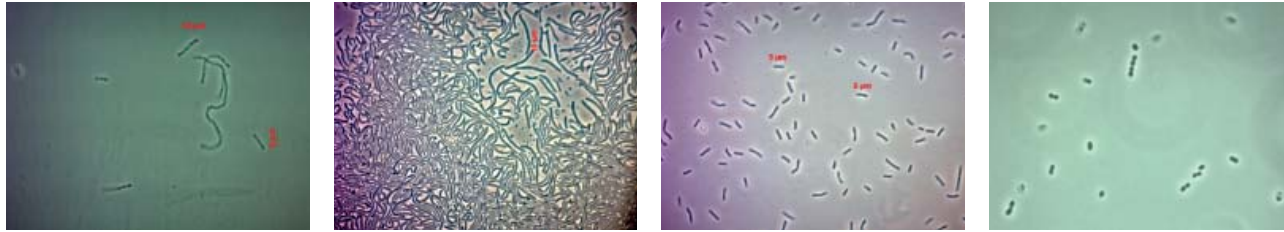


Foto al microscopio di alcuni ceppi della collezione BNSS

Le specie mesofile non starter, *Lactocaseibacillus paracasei* e *Lactiplantibacillus plantarum*, sono state isolate prevalentemente dal formaggio a latte crudo Fiore Sardo; la specie starter termofila *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, è stata frequentemente isolata da Pecorino Romano DOP e dall'innesto naturale termofilo scotta-innesto; *Streptococcus thermophilus*, specie starter termofila, oltre che da Pecorino Romano DOP e scotta-innesto, è stata isolata da Casu axedu. Gli isolati di *Lactococcus lactis*, specie starter mesofila, provengono da Fiore Sardo, Pecorino Sardo artigianale e Casu axedu. Le specie *Latilactobacillus sakei*, *Latilactobacillus curvatus* e *Staphylococcus equorum* sono state isolate da Salsiccia Sarda artigianale, di cui rappresentano il microbiota caratteristico. Parte degli isolati sono stati saggiati per alcune proprietà tecnologiche, utili per eventuali applicazioni in campo (capacità acidificante, lipolitica, proteolitica, profilo fermentativo, produzione di aromi), e per alcune caratteristiche di sicurezza (antibiotico resistenza e produzione di batteriocine). Come accennato sopra, la collezione include anche delle colture naturali miste, liofilizzate *in toto*, dalle quali hanno avuto origine i primi isolati conservati. Tali colture non sono state inserite nel catalogo, che in questa fase include solo ceppi singoli, ma alcune di queste sono già state caratterizzate sia dal punto di vista genotipico (composizione in specie e biotipi) che fenotipico. In particolare, sono state studiate alcune loro proprietà tecnologiche (attività acidificante) e di sicurezza (antibiotico resistenza) e sono state utilizzate con successo, nell'ambito di un progetto di innovazione e trasferimento tecnologico, in alcuni caseifici per la realizzazione di lavorazioni sperimentali di Pecorino Romano.

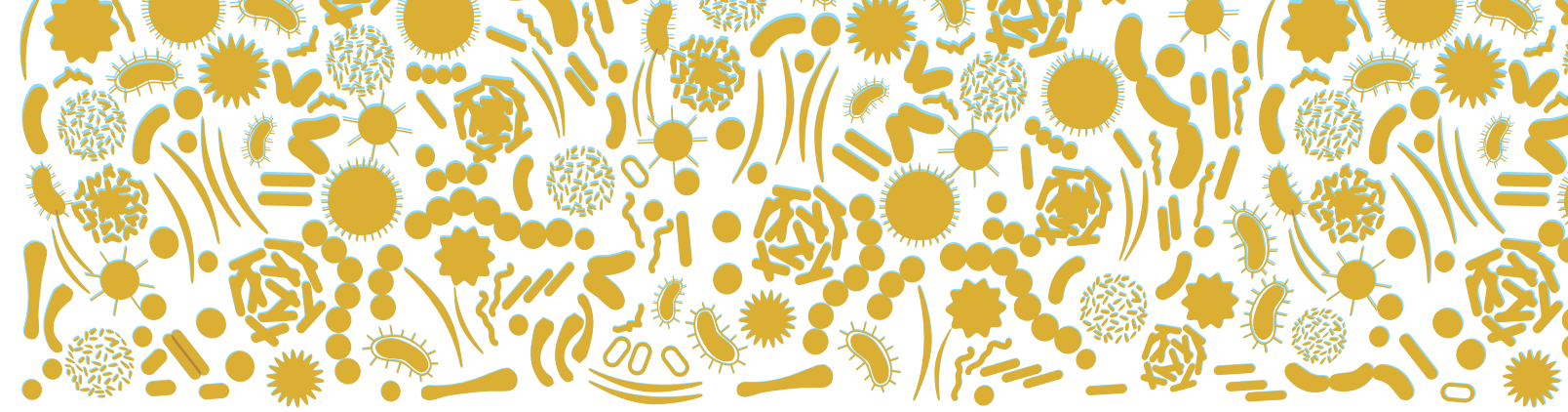
3. Conclusioni e prospettive future

Alla conservazione e tutela della agrobiodiversità microbica è riconosciuto un ruolo essenziale per lo studio e lo sviluppo di applicazioni biotecnologiche, anche nell'industria alimentare, a livello europeo, nazionale e regionale. Il mantenimento della collezione microbica Agris, oltre ad essere importante per la tutela dell'agrobiodiversità, può contribuire allo sviluppo sostenibile dell'economia della Regione Sardegna, attraverso l'utilizzo delle risorse microbiche conservate nelle produzioni agroalimentari sarde. La reintroduzione dei microorganismi che da quei prodotti sono stati isolati e conservati *ex situ* in passato, quando ancora l'utilizzo di ceppi alloctoni selezionati non era così diffuso da minacciare le comunità microbiche autoctone, contribuirebbe al ripristino di parte della biodiversità importante per legare più fortemente i prodotti agroalimentari al territorio.

Molto lavoro è stato fatto per la conservazione *ex situ*, ma tanto ne resta ancora da fare, con investimenti, in termini di risorse umane, materiale e infrastrutture, per continuare a mantenere e gestire le colture in collezione e far sì che non vadano sprecate le energie e le risorse investite dalla Regione. Di seguito si riportano alcuni dei lavori scientifici pubblicati dal Settore Microbiologia di Agris, a partire dalla fondazione della collezione ad oggi.

4. Bibliografia

- Chessa L., Paba A., Daga E., Caredda M., Comunian R., 2020. Optimization of scotta as growth medium to preserve biodiversity and maximise bacterial cells concentration of natural starter cultures for Pecorino Romano PDO cheese. FEMS Microbiology Letters, 367, 2020, fnaa110. doi: 10.1093/femsle/fnaa110
- Paba A., Chessa L., Daga E., Campus M., Bulla M., Angioni A., Sedda P., Comunian R., 2020. Do Best-Selected Strains Perform Table Olive Fermentation Better than Undefined Biodiverse Starters? A Comparative Study. Foods 2020, 9(2), 135; <https://doi.org/10.3390/foods9020135>
- Chessa L., Paba A., Daga E., Comunian R., 2019. Effect of growth media on natural starter cultures composition and performances evaluated by a polyphasic approach. International Journal of Dairy Technology, 72(1): 152-158. doi: 10.1111/1471-0307.12571
- Floris R., Scanu G., Fois N., Rizzo C., Malavenda R., Spanò N., Lo Giudice A., 2018. Intestinal bacterial flora of Mediterranean gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus) as a novel source of natural surface active compounds. Aquaculture Research 49: 1262-1273.
- Comunian R., Ferrocino I., Paba A., Daga E., Campus M., Di Salvo R., Cauli E., Piras F., Zurru R., Cocolin L., 2017. Evolution of microbiota during spontaneous and inoculated Tonda di Cagliari table olives fermentation and impact on sensory characteristics. LWT - Food Science and Technology, 84: 64-72.
- Campus M., Cauli E., Scano E., Piras F., Comunian R., Paba A., Daga E., Di Salvo R., Sedda P., Angioni A., Zurru R., 2017. Towards controlled fermentation of table olives: lab starter driven process in an automatic pilot processing plant. Food and Bioprocess Technology, 10(6): 1063-1073. DOI 10.1007/s11947-017-1882-7.
- Campus M., Sedda P., Cauli E., Piras F., Comunian R., Paba A., Daga E., Schirru S., Angioni A., Zurru R., Bandino G., 2015. Evaluation of a single strain starter culture, a selected inoculum enrichment, and natural microflora in the processing of Tonda di Cagliari natural table olives: impact on chemical, microbiological, sensory and texture quality. LWT - Food Science and Technology 64: 671-677.
- Floris R., Manca S., Fois N., 2013. Microbial ecology of intestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) from two coastal lagoons of Sardinia (Italy). Transitional Waters Bulletin. Volume 7, Issue 2
- Comunian, R., Daga, E., Dupré, I., Paba, A., Devirgiliis, C., Piccioni, V., Perozzi, G., Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L., De Lorentiis, A., Giraffa, G., 2010. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. Int. J. Food Microbiol., 138, 151-156.
- Comunian R., Paba A., Daga E., Dupré I., Scintu M.F., 2010. Traditional and innovative production methods of Fiore Sardo cheese: a comparison of microflora with a PCR-Culture Technique. International Journal of Dairy Technology, 63, 224-233.
- Scintu M.F., Mannu L., Mulargia A.F., Comunian R., Daga E., Paba A., Galistu G., 2007. Microbiological characteristics of ewe's milk and Pecorino Romano PDO Cheese. The Challenge to Sheep and Goats Milk Sectors. Special Issue of the International Dairy Federation 0801/Part 4: 357-359. Available at <http://store.fil-idf.org/wp-content/uploads/2016/12/0801Part4.pdf>
- Daga E., Mannu L., Porcu S., Comunian R., Paba A., Scintu M.F., 2007. Home-made dry sausages produced in Sardinia: an investigation on the microflora. Italian Journal of Food Science, 19(3), 297-308.
- Mannu L., Comunian R., Daga E., Paba A., Demuro P.P., Scintu M.F., 2006. Isolamento e caratterizzazione della microflora naturale colonizzante il formaggio Fiore Sardo (DOP) Scienza e Tecnica Lattiero Casearia, 57 (5), 445-454.
- Mannu L., Paba A., Daga E., Comunian R., Zanetti S., Dupré I., Sechi L. A., 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between Enterococcus faecium strains of dairy, animal, clinical origin. International Journal of Food Microbiology 88, 291-304.
- Mannu L., Riu G., Comunian R., Fozzi M.C., Scintu M.F., 2002. A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewe's milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening. International



La storia, l'organizzazione e le possibili applicazioni delle collezioni Microbiche Della Sardegna

LA COLLEZIONE UNISS

Marilena Budroni, Ilaria Mannazzu, Virgilio Balmas, Angela Bianco, Giacomo Zara, Severino Zara e Chiara Multineddu.

1. La storia

L'istituzione di collezioni microbiche locali costituisce uno strumento determinante per l'innovazione delle produzioni alimentari. Infatti, la valorizzazione, il miglioramento e la sostenibilità delle stesse sono azioni strettamente dipendenti dalla possibilità di coniugare le materie prime, i sottoprodotti delle lavorazioni e le risorse microbiche di ciascun territorio. A tal fine, il lavoro pionieristico del Prof. Augusto Capriotti dell'Università di Sassari ha posto le basi, già dagli anni '60, per la creazione di una collezione microbica costituita da lieviti, batteri e funghi isolati da diverse matrici alimentari e ambientali locali e non solo. Questa collezione si è arricchita, nel corso di 60 anni, grazie agli studi condotti dai ricercatori dell'Istituto di Microbiologia generale ed applicata del Dipartimento di Agraria. Recentemente questa collezione storica insieme a quella dell'Istituto di Patologia vegetale dello stesso Dipartimento, si è costituita in collezione UNISS ed è entrata a far parte della collezione sarda MBDS (Microbial Biodiversity of Sardinia), istituita grazie al progetto Microbiodiversar e della rete e della rete di collezioni MIRRI-IT (*Microbial Resource Research Infrastructure*-Italia). MIRRI-IT fa parte di MIRRI Europe che è la più grande infrastruttura europea di ricerca dedicata alla salvaguardia della biodiversità microbica e alla conservazione, distribuzione e valorizzazione di specie microbiche.

2. L'organizzazione

Le Collezioni Microbiche di Microbiologia Generale E Applicata E Patologia Vegetale Verso la collezione UNISS

Le diverse aree della Sardegna, il territorio nazionale e internazionale hanno fornito substrati idonei all'isolamento della biodiversità microbica messa in condivisione nella collezione MBDS. Attualmente i ceppi della collezione UNISS sono conservati in freezer a -80 °C, in dotazione nelle due Sezioni di appartenenza della collezione UNISS, e nella microbank. Presto tutte le colture saranno liofilizzate.

Dairy Journal 12, 17-26.

Mannu, L., Comunian, R., & Scintu, M. F., 2000. Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. International Dairy Journal, 10, 383-389. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00074-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00074-1)

Ledda, A., Scintu, M.F., Pirisi, A., Sanna, S., Mannu, L., 1994. Caratterizzazione tecnologica di ceppi di Lattococchi e di Enterococchi per la produzione di formaggio pecorino Fiore Sardo. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia, 45, (5), 443-456.

Arrizza, S., Ledda, A., Sarra, P. G., Dellaglio, F., (1983). Identification of Lactic Acid Bacteria in Gioddu. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia, 34,(2), 87-102.

Dellaglio, F., Arrizza, S., Ledda, A., 1981. Classification of Citrate Fermenting Lattobacilli Isolated from Lamb Stomach, Sheep Milk and pecorino Romano Cheese. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 2, 349-356. [https://doi.org/10.1016/S0721-9571\(81\)80028-2](https://doi.org/10.1016/S0721-9571(81)80028-2)

Ledda A., 1969. Microbiologia del formaggio Pecorino "Romano". Nota II: Caratteri fisiologici di lattobacilli termofili isolati da scotta-fermento. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia. 20 (1969), pp. 305-314

Bottazzi V. e Ledda A., 1967. Nota 1. Studio della microflora dello scotta-fermento usato nella produzione del Pecorino "Romano". Ann. Micr.17, 41-53.

Si ringraziano tutti coloro che, in oltre 50 anni, con il loro lavoro, la loro professionalità e passione, hanno contribuito a conservare e proteggere parte dell'agrobiodiversità microbica della Sardegna:

Arrizza S., Baffigo P., Battistotti B., Bottazzi V., Cadoni C., Canu, Chelo G., Chessa F., Chessa L., Coinu R., Comunian R., Cosso G., Daga E., Dematteis E., Demuro P.P., Dettori M., Duprè I., Falchi L., Felis G., Ferrocino I., Floris R., Fozzi M.C., Frassetto M., Galistu G., Lei P.N., Mannu L., Marceddu M.F., Mesina N.G., Murgia A., Nieddu G., Nuvoli L., Paba A., Pes A., Pes M., Pilichi S., Pintus S., Pretta C., Riu G., Sanna G., Sanna S., Santoru A., Sassu, Schirru S., Scintu M.F., Trentadue M., Usai, Vidili L.

Microbiologia Generale e Applicata

L'Istituto di Microbiologia Generale e Applicata ha inserito nella collezione MBDS 86 specie di lieviti e batteri di origine agro-alimentare, a partire dai primi isolamenti che risalgono al 1965 sino ad oggi. Principalmente si tratta di lieviti isolati da matrici alimentari e ambientali quali olive e olio d'oliva, latte e formaggi, uva, vino e mosto, pesce, molluschi, carne, e sottoprodotti della lavorazione della birra quali trebbie, suolo e acque reflue (Santona et al., 2018; Bianco et al 2020). In particolare, la collezione microbica dell'Istituto di Microbiologia Generale e Applicata è fortemente caratterizzata dalla presenza di lieviti vinari che, dal 1967 sino ad oggi, hanno avuto un forte incremento numerico, grazie ad un'estesa campagna di isolamento e caratterizzazione fisiologica e tecnologica. I caratteri tecnologici più importanti presi in esame sono il vigore fermentativo, la resistenza alla SO₂ e ai fitofarmaci, la capacità di aderire alle superfici e di formare biofilm (Zara et al 2009, Coi et al., 2017), il fattore killer, la capacità di produrre o ridurre l'acido malico, la sintesi di prodotti solforati e acetaldeide (Mannazzu et al, 2002; Mannazzu et al., 2019). Fra i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* presenti in collezione, assumono particolare interesse i lieviti flor. Questi lieviti sono stati isolati in gran parte da mosti e vini campionati nelle cantine in attività sul territorio della DOC Vernaccia, Malvasia di Bosa e Arvisionadu del Goceano. I lieviti flor presenti in collezione costituiscono un patrimonio di biodiversità microbica unico in Sardegna e nel mondo, insieme a poche altre collezioni in Spagna, Francia e Ungheria.

Per quanto riguarda i batteri, a partire dal 2012, sono stati isolati e caratterizzati geneticamente, 91 ceppi appartenenti a 36 specie, suddivisi in 50 differenti profili biochimici. I batteri presenti nella collezione sono quasi totalmente di origine sarda e derivano da cinque differenti substrati: olio d'oliva, mosto, grano, orzo e malto (Bianco et al, 2018; Bianco et al., 2019; Fancello et al., 2020)

Patologia Vegetale

In questa Collezione sono incluse 15 specie diverse di *Fusarium* a cui appartengono 86 ceppi isolati da terreni incolti della Sardegna, da piante di interesse agrario (frumento, riso, mais, pomodoro) e dall'uomo. Sessantadue ceppi sono stati isolati in Sardegna tra il 2001 e il 2018, inoltre un totale di 72 ceppi presenti in collezione sono riportati in 6 pubblicazioni. L'identificazione delle diverse specie è stata effettuata partendo da colture monosporiche, attraverso l'osservazione delle caratteristiche morfologiche e in molti casi anche con metodi molecolari o l'analisi delle sequenze del gene dell'allungamento ifale (Translation Elongation Factor (EF-1- α)). Trenta isolati sono stati depositati anche nella collezione USDA Northern Regional Research Laboratory (NRRL) culture collection in Peoria, IL, USA.

Prospettive

Gli starter

Uno starter è una coltura microbica impiegata allo scopo di avviare e condurre un processo di

trasformazione in maniera riproducibile (DeVero, 2010). Molti dei microrganismi conservati nella collezione UNISS sono stati selezionati sulla base di caratteristiche di interesse biotecnologico e sono quindi potenziali starter microbici. Gli starter "selezionati" disponibili nella collezione UNISS, sono costituiti da colture pure di microrganismi caratterizzati su scala di laboratorio, nel corso di prove pilota e su scala semi-industriale e possono quindi essere utilizzati con successo in ambito produttivo. Ad esempio, i diversi ceppi di *Fusarium* presenti in collezione possono essere utilizzati per studi su prove di patogenicità su piante di interesse agrario o per l'utilizzo dell'efficacia di composti chimici, naturali o di microrganismi biologici, nel contenimento dei danni causati dalle specie di *Fusarium*.

Dalla Coltura pura ai Microbiomi: la sfida per il futuro delle collezioni microbiche

Un microbioma è un sistema dinamico e complesso costituito da batteri, funghi, archea, alghe, protisti e virus, caratteristico di un individuo (umano, animale, vegetale) o di un ambiente. Il principio che regola la formazione e il funzionamento di un microbioma è lo stesso, qualunque sia la sua origine. Una recente rivisitazione del significato di microbioma propone che con questo termine si definisca l'ambito di attività dei microrganismi che vivono in un determinato ecosistema. I microbiomi rappresentano quindi il nuovo paradigma nell'approccio scientifico alla conservazione e alla valorizzazione della biodiversità microbica. Ne consegue che le collezioni di colture microbiche in purezza dovranno evolversi o ospitare sezioni configurate come biobanche per la conservazione di porzioni di suolo, tessuti animali, matrici alimentari che contengono e ospitano i microbiomi (Ryan et al., 2020). È infatti da più parti sostenuto che la qualità dei prodotti alimentari, per esempio di origine vegetale quali il vino, possa essere legata al microbiota nel suo complesso e che solo attraverso lo studio e la conoscenza del microbiota sia possibile legare i prodotti alimentari al territorio di produzione (Di Liu et al., 2019).

La start up

Per rendere disponibili queste colture sia ai ricercatori che ne faranno richiesta sia alle imprese artigianali e industriali interessate ad un loro utilizzo commerciale, la collezione UNISS si sta dotando di una Start up, denominata BIOMIA, che si occuperà anche di produrre e distribuire gli starter. BIOMIA si occuperà della ricerca, selezione, conservazione, moltiplicazione, produzione e vendita di lieviti e batteri per l'industria agroalimentare, in particolare per aziende produttrici di prodotti fermentati a indicazione geografica. BIOMIA proporrà inoltre diversi servizi e competenze, nel settore agro-alimentare e agro-ambientale, per la produzione e l'ottimizzazione di starter microbici, il monitoraggio microbiologico e chimico del processo produttivo, la gestione dei rifiuti e l'assicurazione della qualità e sicurezza dei prodotti finali. La start up BIOMIA universitaria mira non solo a valorizzare il patrimonio conoscitivo e di relazioni internazionali ormai consolidati dai ricercatori di Microbiologia Generale e Applicata nel corso di oltre vent'anni di intensa attività di ricerca, ma si propone, nel quadro di un approccio sistemico alla R&S agroalimentare, come effettivo anello mancante nel trasferimento

tecnologico delle biotecnologie alimentari. BIOMIA sarà una buona opportunità, soprattutto per le piccole e medie aziende, per coniugare tradizione e tecnologie che possano davvero contribuire a gestire e standardizzare i processi fermentativi evitando al contempo l'appiattimento qualitativo della produzione industriale. Inoltre, BIOMIA fornirà consulenze per: i) biorisanamento (bioprotettori, biostimolanti e biofertilizzanti); ii) monitoraggio di processi catalizzati da microrganismi, in ambito alimentare, ambientale e agrario; iii) certificazione di qualità e sicurezza dei prodotti.

Bibliografia

- Balmas V., A. Marcello, F. Masia, Q. Migheli. 2008. First report of *Fusarium globosum* in Europe. X International *Fusarium* and *Fusarium* Genomics, Workshop- Alghero 30 Agosto-2 Settembre 2008. Journal of Plant Pathology 9, [3 supplement], S47.
- Balmas V., Q. Migheli, B. Scherm, P. Garau, K. O'Donnell, G. Ceccherelli, S. Kang, D. M. Geiser, 2010. Multilocus molecular phylogenetics indicate high levels of endemic fusaria inhabit Sardinian soils (Tyrrhenian Islands). Mycologia 102, [4]: 803-812.
- Balmas V., Scherm B., Marcello A., Beyer M., Hoffmann L., Migheli Q., Pasquali M. 2015. *Fusarium* species and chemotypes associated with fusarium head blight and fusarium root rot on wheat in Sardinia. Plant Pathology 64, 972-979. Doi: 10.1111/ppa. 12337.
- Bianco A., Budroni M., Zara S., Mannazzu I., Fancello F., Zara G. 2020. The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. Appl Microbiol Biotechnol. 2020 Oct;104(20):8661-8678. doi: 10.1007/s00253-020-10843-1.
- Bianco A., F. Fancello, V. Balmas, G. Zara, M. Dettori, M. Budroni. 2018. The microbiome of Sardinian barley and malt. J. Inst. Brew. 124(4): 344-351.
- Bianco A., F. Fancello, V. Balmas, V., M: Dettori, A. Motroni, G. Zara, M. Budroni. 2019. Microbial communities and malt quality of durum wheat used in brewing. J. Inst. Brew. 125(2): 222-229.
- Coi A.L., F. Bigey, S. Mallet, S. Marsit, G. Zara, P. Gladieux, V. Galeote, M. Budroni, S. Dequin, J.L. Legras. 2017. Genomic signatures of adaptation to wine biological ageing conditions in biofilm-forming flor yeasts. Mol Ecol.; 26(7):2150-2166.
- De Vero L., P. Giudici. 2010. Collezione di microrganismi e loro impiego per la selezione delle colture starter - In: Industria delle bevande. ISSN 0390-0541. - . 227: 22-26.
- Di Liu, Pangzheng Zhang, Deli Chen, Kate Howell. [2019]. From the vineyard to the winery: how microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. Frontiers in Microbil. doi: 10.3389/fmicb.2019.02679
- Fancello F., Multineddu C., Santona M., Deiana P., Zara G., Mannazzu I., Budroni M., Dettori S., Zara S. 2020. Bacterial biodiversity of extra virgin olive oils and its potential biotechnological exploitation. Microorganisms. 8, 97. doi:10.3390/microorganisms8010097
- Mannazzu I., Clementi F., Ciani M. 2002. Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. In "Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts" pp 19-33 M. Ciani (ed.) Research Signpost (Trivandrum, India).

- Mannazzu I., Domizio P., Carboni G., Zara S., Zara G., Comitini F., Budroni M., Ciani M. 2019. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. Critical Reviews in Biotechnology, 39(5):603-617.
- Migheli Q., V. Balmas, H. Harak, S. Sanna, B. Scherm, T. Aoki, K. O'Donnell. 2010. Molecular phylogenetic diversity of dermatologic and other human pathogenic Fusaria from hospitals in Northern and Central Italy. Journal of Clinical Microbiology 48, [4], 1076-1084.
- Oufensou S., B. Scherm, G. Pani, V. Balmas, D. Fabbri, M.A. Dettori, P. Carta, I. Malbràn, Q. Migheli, G. Delogu. 2019. Honokiol, magnolol and its monoacetyl derivative show strong anti-fungal effect on *Fusarium* isolates of clinical relevance.

PLOS One 14(9): e0221249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221249> .

- Ryan M.J. et al., (2020). Development of microbiome biobanks –challenges and opportunities Trends in Microbiology. Article in press.

- Santona M., Sanna M.L., Multineddu C., Fancello F., de la Fuente S.A., Dettori S., Zara S. 2018. Microbial biodiversity of Sardinian oleic ecosystems. Food Microbiology, 70, pp. 65-75.

- Scherm B., V. Balmas, A. Infantino, M.A. Aragona, M.T. Valente, F. Desiderio, A. Marcello, S. Phanthavong, L.W. Burgess, D. Rau, 2019. Clonality, spatial structure and pathogenic variation in *Fusarium fujikuroi* from rain-fed rice in southern Laos. PLOS ONE 14 (12): e0226556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226556>.

- Zara G., S. Zara, C. Pinna, S. Marceddu, and M. Budroni. 2009. FL011 gene length and transcriptional level affect biofilm forming ability of wild flor strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology-SGM, 155(12): 3838 – 3846.



La storia, l'organizzazione e le possibili applicazioni delle collezioni microbiche della Sardegna

LA COLLEZIONE UNICA

Sofia Cosentino, Maura Deplano, Maria Elisabetta Fadda e Maria Barbara Pisano

Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università di Cagliari

1. Microrganismi e biodiversità agro-alimentare

La biodiversità agro-alimentare comprende la varietà e variabilità di animali, piante e microrganismi che sono importanti per il cibo e l'agricoltura e che sono il risultato delle interazioni tra l'ambiente, le risorse genetiche e i sistemi di gestione e le pratiche usate dagli uomini [1]. Secondo quanto recentemente riportato dalla FAO nel rapporto 'Stato della biodiversità mondiale per l'alimentazione e l'agricoltura' [2], la biodiversità alla base dei nostri sistemi alimentari, è in calo in tutto il mondo. E ciò che è perso - specie di piante, animali e microrganismi - non può essere recuperato. Il che pone il futuro del nostro cibo e dell'ambiente in grave pericolo. In particolare, i microrganismi rivestono un ruolo funzionale fondamentale nei sistemi agricoli, infatti sono coinvolti sia nella produzione di cibo (fertilità del suolo, nutrizione delle colture, biocontrollo, biofertilizzazione) che nella conservazione delle derrate alimentari (tossine e patogeni), che nella produzione di alimenti trasformati (latte e formaggi, vino, ecc), pertanto la loro presenza e la loro biodiversità è funzionale al sostentamento degli organismi viventi sulla terra [3]. La conoscenza e la conservazione della biodiversità microbica di interesse agrario per il comparto inerente gli alimenti assume, pertanto, un ruolo chiave, in quanto conservare i microrganismi di rilievo alimentare significa tutelare i prodotti tipici nazionali e tutta la tradizione enogastronomica italiana. La costituzione della collezione UNICA risponde a pieno alle esigenze di conservazione della biodiversità microbica agro-alimentare del territorio della Sardegna.

2. La collezione UNICA-DSMSP

La collezione UNICA fu avviata nel 1985 per iniziativa della prof.ssa Francesca Palmas, responsabile della allora sezione di Igiene del Dipartimento di Biologia Sperimentale, poi confluita nel Dipartimento

di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, ed oggi ricompresa nel Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica dell'Università di Cagliari. Nel corso di questi 35 anni diversi ricercatori di UNICA hanno isolato, caratterizzato e preservato microorganismi dotati di notevoli potenzialità applicative (in campo ambientale, della salute, dell'agroalimentare) da diverse matrici ambientali ed alimentari. La collezione microbica UNICA-DSMSP è composta da circa 1.000 ceppi tra batteri, principalmente rappresentati da batteri lattici (appartenenti a 13 generi e 24 specie), lieviti (15 generi e 31 specie) e muffe (16 generi e 24 specie), come indicato nella Tabella 1.

Tabella 1 - Distribuzione in generi e specie dei microrganismi conservati nella collezione UNICA-DSMSP.

Batteri		Lieviti		Muffe	
Genere	Specie	Genere	Specie	Genere	Specie
<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	<i>Acremonium</i>	<i>spp.</i>
	<i>faecalis</i>		<i>atlantica</i>	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>
	<i>faecium</i>		<i>catenulata</i>	<i>Arthrinium</i>	<i>phaeospermum</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>		<i>incospicua</i>	<i>Ascosphaera</i>	<i>apis</i>
	<i>helveticus</i>		<i>krusei</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>
<i>Lentilactobacillus</i>	<i>buchneri</i>		<i>parapsilosis</i>		<i>ochraceus</i>
<i>Lacticaseibacillus</i>	<i>casei</i>		<i>sake</i>		<i>sydowii</i>
	<i>rhamnosus</i>		<i>utilis</i>		<i>terreus</i>
	<i>paracasei</i>		<i>zeylanoides</i>	<i>Chrysonilia</i>	<i>sitophila</i>
<i>Limosilactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>curvatus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>herbarum</i>
<i>Loigolactobacillus</i>	<i>coryniformis</i>		<i>uniguttulatus</i>	<i>Eupenicillium</i>	<i>ochrosalmoneum</i>
<i>Levilactobacillus</i>	<i>brevis</i>	<i>Cutaneotrichosporon</i>	<i>guehoae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>
<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>paraplantarum</i>	<i>Cystobasidium</i>	<i>slooffiae</i>	<i>Mucor</i>	<i>hiemalis</i>
	<i>pentosus</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>		<i>plumbeus</i>
	<i>plantarum</i>	<i>Filobasidium</i>	<i>uniguttulatum</i>		<i>recurvus</i>
<i>Latilactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>sphaerica</i>
	<i>sakei</i>	<i>Hannaella</i>	<i>oryzae</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>variotii</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>	<i>Penicillium</i>	<i>glabrum</i>
	<i>lactis cremoris</i>		<i>marxianus</i>		<i>janthinellum</i>
	<i>raffinolactis</i>	<i>Pichia</i>	<i>kudriavzevii</i>		<i>terrestre</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>mucillaginosa</i>		<i>pinophilum</i>
		<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		<i>purpureogenum</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>	<i>Trichosporon</i>	<i>aquatile</i>	<i>Phoma</i>	<i>spp.</i>
	<i>pentosaceus</i>		<i>cutaneum</i>	<i>Talaromyces</i>	<i>stipitatus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>		<i>gracile</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>koningii</i>
			<i>jirovecii</i>		<i>longibrachiatum</i>
			<i>lactis</i>		
			<i>mucoides</i>		
		<i>Wickerhamiella</i>	<i>pararugosa</i>		
		<i>Yarrowia</i>	<i>deformans</i>		
			<i>lipolytica</i>		

I ceppi della collezione UNICA-DSMSP sono stati isolati da diverse matrici alimentari, soprattutto prodotti lattiero caseari sardi - latte di pecora e capra, varie tipologie di prodotti tipici (Fiore Sardo, Casu Axedu, Pecorino Sardo, Ricotta) – ma anche da miele, mitili, pasta fresca, salumi.

La collezione microbica UNICA-DSMSP rappresenta una preziosa fonte di risorse in grado di favorire l’innovazione dell’industria agro-alimentare regionale e contribuire al miglioramento qualitativo e igienico-sanitario dei diversi prodotti, nonché uno strumento per tutelare e valorizzare le risorse di biodiversità microbica acquisite. Infatti, il sistema produttivo agro-alimentare sardo, seppur molto sensibile al legame con il territorio, all’aspetto nutrizionale e a quello salutistico, è spesso costituito da piccole e micro realtà produttive, che da sole non sono in grado di sostenere spese per la ricerca e lo sviluppo di nuovi prodotti e la salvaguardia di quelli esistenti.

Il potenziale tecnologico e la biodiversità dei microrganismi presenti nella collezione microbica di UNICA possono, previa attenta e accurata caratterizzazione, essere sfruttati per diverse finalità applicative, quali:

1) *L'utilizzo dei ceppi come agenti fermentativi (colture starter e integrative):* i microrganismi coinvolti nella produzione di alimenti e bevande fermentate sono costituiti principalmente da lieviti e batteri lattici, che possono intervenire come microflora primaria o secondaria nei processi produttivi. Nell’industria alimentare moderna, l’impiego di colture microbiche starter è ormai considerata una pratica irrinunciabile per la produzione di formaggi, insaccati, vino, pane, olive, ecc., ma il ricorso sempre più frequente alle colture starter di tipo commerciale, spesso ottenute a partire da microrganismi conservati e venduti da aziende multinazionali, se da un lato garantisce il raggiungimento negli alimenti fermentati di traguardi produttivi standardizzati e sicuri, dall’altro porta ad un parziale “appiattimento” delle caratteristiche dei differenti prodotti finali, i quali, pur partendo da una materia prima spesso tipica del territorio di produzione, rischiano di perdere una parte della loro tipicità. Sarebbe quindi auspicabile l’uso di colture autoctone provenienti dagli specifici ambienti di produzione.

2) *L'utilizzo dei ceppi come colture bioprotettive per aumentare la sicurezza e la shelf-life dei prodotti:* con il termine bioprotezione si indica l’utilizzo di microrganismi, o di loro metaboliti, per il controllo di microbiota patogeni o alteranti negli alimenti. Questo approccio di tipo biologico ha acquisito particolare rilevanza specialmente negli ultimi anni, in seguito alla richiesta da parte del consumatore di alimenti sempre più freschi e naturali, senza aggiunta di conservanti e non sottoposti a trattamenti tecnologici spinti.

3) *La messa a punto di prodotti innovativi per nuovi segmenti di mercato (prodotti a ridotto tenore di lattosio, a ridotto contenuto di grasso, con probiotici):* la crescente consapevolezza del legame fra alimentazione e salute ha portato ad un aumento della richiesta di alimenti più sani o capaci di influenzare positivamente il nostro stato di salute, i cosiddetti “alimenti funzionali” (4). Esempi di alimenti funzionali sono gli alimenti con aggiunta di sostanze biologicamente attive come antiossidanti e probiotici. Recentemente, un’attenzione particolare è stata rivolta dalla comunità scientifica alle proprietà funzionali dei microrganismi associati agli alimenti artigianali fermentati (5,6).

3. Caratterizzazione dei microrganismi della collezione

I ceppi di batteri lattici e lieviti autoctoni conservati nella collezione UNICA-DSMSP sono stati in gran parte caratterizzati a livello tassonomico, biochimico, molecolare, tecnologico e funzionale per un potenziale utilizzo applicativo nell’industria alimentare.

Come riassunto nella Tabella 2, i ceppi sono stati identificati fenotipicamente sulla base di numerosi caratteri tassonomici e biochimici, e la identificazione è stata confermata mediante PCR specie specifica. Gli isolati sono poi stati sottoposti a prove tecnologiche rilevanti per il loro utilizzo nei processi fermentativi, quali la produzione di sostanze aromatiche (derivante dai metabolismi del piruvato e del citrato), l’attività proteolitica (che contribuisce allo sviluppo dell’aroma attraverso la liberazione di peptidi e amminoacidi), l’attività lipolitica. Queste proprietà, che hanno la capacità di influenzare il processo produttivo, le sfumature aromatiche, la consistenza e la texture dei prodotti, sono fondamentali nella produzione di una vasta gamma di alimenti che vanno dai salumi ai formaggi, al vino. Per la caratterizzazione molecolare, i ceppi sono stati analizzati con la tecnica PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) o PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Numerosi ceppi sono anche stati sottoposti a sequenziamento per confermarne l’identificazione.

Oltre a conferire tipicità e qualità agli alimenti, i microrganismi autoctoni possono essere dotati di proprietà funzionali d’interesse probiotico e quindi utili al benessere del consumatore. A tal fine, sono state valutate importanti proprietà quali la capacità di sopravvivere al passaggio nel tratto digerente (con il test SSDP- Simulated Stomach-Duodenum Passage); la stabilità a valori estremi di pH e a elevate concentrazioni di sali biliari (essenziali perché il probiotico possa raggiungere l’intestino in una condizione ottimale); la capacità di aderire alle cellule intestinali (che rappresenta sia il primo passo nel processo di colonizzazione che uno dei meccanismi con cui i probiotici esercitano la loro azione); la capacità di antagonizzare la flora microbica patogena e/o alterante mediante la produzione di diverse sostanze ad azione antimicrobica (acidi organici, perossido d’idrogeno, anidride carbonica, batteriocine).

Tabella 2 - Test effettuati per la caratterizzazione dei ceppi della collezione.

Caratterizzazione	Batteri	Lieviti
Tassonomica - Biochimica	morfologia Gram-positività assenza dell’enzima catalasi produzione di gas dal glucosio produzione di NH ₃ da arginina idrolisi dell’esculina sviluppo a 10°, 15°, 40°, 45°C tolleranza al 6,5 e 10% di NaCl sviluppo a pH 3,9 e 9,6 profilo di fermentazione dei carboidrati	morfologia fermentazione di GLU-GAL-LAC assimilazione LAC-LAT-CIT test ureasi sviluppo a 10°, 15°, 45°C

Caratterizzazione	Batteri	Lieviti
Molecolare	PCR specie-specifica PCR-RAPD sequenziamento regione 16S rDNA	PCR specie-specifica PCR-RFLP sequenziamento regione D1-D2 26S rDNA
Tecnologica	attività acidificante attività proteolitica attività lipolitica	attività proteolitica attività lipolitica crescita al 6, 10, 15, 20% di NaCl
	attività citrato-fermentante coagulazione del latte API ZYM	
Funzionale	sopravvivenza a pH 2.0 e 2,5 simulated stomach-duodenum passage capacità autoaggregante idrofobicità di superficie adesione alle cellule intestinali attività antimicrobica in vitro e in situ deconiugazione sali biliari sensibilità agli antibiotici assimilazione colesterolo	sopravvivenza a pH 2.0 e 2,5 simulated stomach-duodenum passage capacità autoaggregante idrofobicità di superficie adesione alle cellule intestinali attività killer deconiugazione sali biliari

Relativamente allo studio delle caratteristiche fenotipiche e funzionali dei ceppi, per entrambi i gruppi microbici è stato possibile evidenziare, sia tra specie diverse sia tra ceppi appartenenti alla stessa specie, una certa variabilità nei risultati delle prove effettuate. Questa biodiversità è presumibilmente da ascrivere al fatto che si tratta di ceppi autoctoni, con caratteristiche legate alle diverse zone di produzione.

4. Applicazione dei microrganismi della collezione

Numerosi ceppi della collezione UNICA-DSMSP sono stati utilizzati, nel corso degli anni, in progetti di ricerca, i cui risultati sono stati oggetto di pubblicazioni scientifiche e presentazione a convegni nazionali e internazionali, finalizzati a:

1) *L'utilizzo come agenti fermentativi (colture starter e integrative) per l'ottenimento di numerosi prodotti:* le ricerche da noi condotte, rivolte alla caratterizzazione del microbiota ed alla preservazione della biodiversità presente in prodotti artigianali tipici sardi, hanno evidenziato come nelle produzioni tipiche siano presenti microrganismi autoctoni che con le loro attività di tipo metabolico sono alla base dei processi di fermentazione e che portano all'ottenimento di alimenti dalle caratteristiche qualitative uniche (7-13). I ceppi isolati sono stati caratterizzati, selezionati e utilizzati come innesti autoctoni in sperimentazioni pilota con successiva valutazione organolettica, chimico-fisica e microbiologica dei prodotti ottenuti, che hanno presentato caratteristiche qualitative elevate (14-16).

2) *L'utilizzo come colture bioprotettive al fine di aumentare la sicurezza e la shelf-life dei prodotti e garantire una maggiore sostenibilità del processo produttivo:* le nostre ricerche hanno evidenziato come, accanto alla capacità prettamente fermentativa, alcuni ceppi autoctoni dotati di attività antagonista sono risultati in grado di inibire lo sviluppo di altri microrganismi, sia patogeni, che alterativi. Sono stati caratterizzati sia batteri lattici produttori di batteriocine attive contro il patogeno alimentare *Listeria monocytogenes*, ma anche lattobacilli con attività antifungina, e lieviti produttori di proteine killer. Questi ceppi usati come starter microbici, sono risultati capaci di migliorare sia la qualità igienico-sanitaria che la conservabilità dei prodotti (17-19).

3) *La messa a punto di prodotti innovativi/salutistici per nuovi segmenti di mercato.* Negli ultimi anni è emersa tra le priorità della ricerca in campo agro-alimentare, la produzione di alimenti funzionali innovativi che rappresentino un volano per il territorio, attraverso la valorizzazione di produzioni tipiche locali. I nostri studi hanno evidenziato la presenza, soprattutto in prodotti artigianali tipici, di batteri lattici e lieviti dotati di proprietà funzionali di interesse probiotico, e alcuni di questi sono stati utilizzati con successo nella produzione di formaggi (20-22).

4. Bibliografia

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1999. Agricultural Biodiversity, Multifunctional Character of Agriculture and Land Conference, Background Paper 1, Maastricht.

2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2019.The state of the world’s biodiversity for food and agriculture. FAO Commission on genetic resources for food and agriculture.

3. Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, 2013. Linee guida per la conservazione e la caratterizzazione della biodiversità vegetale, animale e microbica di interesse per l’agricoltura. Piano Nazionale sulla Biodiversità di Interesse Agricolo, Inea , Roma.

4. Rincón-León F., 2003. Functional Foods, in: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), B. Caballero, P. Finglas, F. Toldra (Eds), Academic Press. ISBN: 9780122270550.

5. Hatoum R., Labrie S., and Fliss I., 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Frontiers in Microbiology, 3, 421. doi: 10.3389/fmicb.2012.00421

6. Caggia C., De Angelis M., Pitino I., Pino A., Randazzo C.L., 2015. Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. Food Microbiology 50, 109-17.

7. Fadda M.E., Cosentino S., Deplano M., Palmas F., 2001. Yeast populations in Sardinian feta cheese. International Journal of Food Microbiology, 69, 153-156.

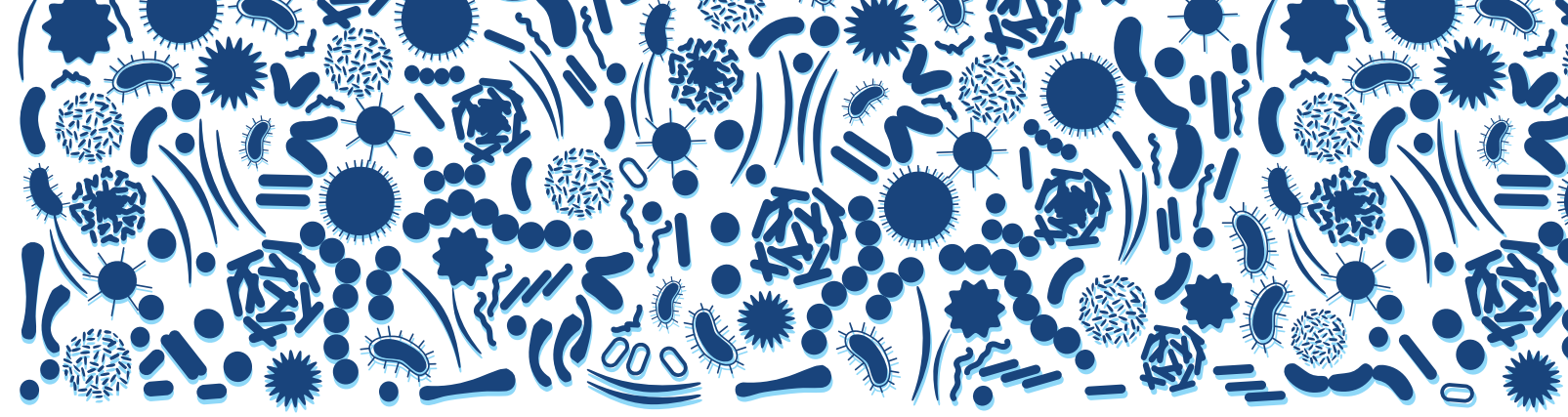
8. Cosentino S., Fadda M.E., Deplano M., Mulargia A.F., Palmas F., 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe’s dairy products. International Journal of Food Microbiology. 69, 53-58.

9. Cosentino S., Pisano M.B., Corda A., Fadda M.E., Piras C., 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. Journal of Dairy Research, 71, 444-450.

10. Fadda M.E., Mossa V., Pisano M.B., Deplano M., Cosentino S., 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese, International Journal of Food Microbiology. 95, 51-59.

11. Pisano M.B., Fadda M.E., Deplano M., Corda A., Cosentino S., 2006. Microbiological and chemical characterization of Fiore Sardo, a traditional Sardinian cheese made from ewe’s milk. International Journal of Dairy Technology, 59, 171-179.

12. Fadda M.E., Viale S., Deplano M., Pisano M.B., Cosentino S., 2010. Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat’s milk collected in Sardinia. International Journal of Food Microbiology, 136, 376-380.



13. Pisano M.B., Deplano M., Fadda M.E., Cosentino S., 2019. Microbiota of Sardinian goat's milk and preliminary characterization of prevalent LAB species for starter or adjunct cultures development. BioMed Research International, art. no. 6131404.
14. Pisano M.B., Fadda M.E., Deplano M., Corda A., Casula M., Cosentino S., 2007. Characterization of Fiore Sardo cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. Journal of Dairy Research, 74, 255-261.
15. Pisano M.B., Casula M., Serci V., Corda A., Deplano M., Fadda M.E., Cosentino S., 2008. Characterization of goats' milk cheeses manufactured with the addition of adjunct cultures. Special Issue of International Dairy Federation 0801/Part 3 "The Challenge to Sheep and Goat Milk Sectors", 263-265.
16. Piras C., Marincola F.C., Savorani F., Engelsen S.B., Cosentino S., Viale S., Pisano M.B., 2013. A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. Food Chemistry, 141, 2137-2147.
17. Pisano M.B., Fadda M.E., Deplano M., Cosentino S., 2010. Caratterizzazione dell'attività anti-*Listeria* di *Lactococcus lactis* susp. *lactis* isolati da prodotti lattiero-caseari sardi. Pediatria Medica Chirurgica 32, 176-179.
18. Cosentino S., Fadda M.E., Deplano M., Melis R., Pomata R., Pisano M.B., 2012. Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. Journal of Biomedicine and Biotechnology, art. no. 376428.
19. Cosentino S., Viale S., Deplano M., Fadda M.E., Pisano M.B., 2018. Application of autochthonous *Lactobacillus* strains as biopreservatives to control fungal spoilage in caciotta cheese. BioMed Research International, art. no. 3915615.
20. Pisano M.B., Corda A., Serci V., Deplano M., Fadda M.E., Cosentino S., 2005. Potenziali proprietà probiotiche di enterococchi isolati da prodotti lattiero-caseari artigianali. Igiene Moderna 124, 49-64.
21. Pisano M.B., Viale S., Conti S., Fadda M.E., Deplano M., Melis M.P., Deiana M., Cosentino S., 2014. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. BioMed Research International, art. no. 286390.
22. Fadda M.E., Mossa V., Deplano M., Pisano M.B., Cosentino S., 2017. In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. LWT - Food Science and Technology, 75, 100-106.

Portale sulla Biodiversità Microbica della Sardegna e del database dei cataloghi delle tre collezioni sarde di microorganismi di interesse agroalimentare

Paolo Romano

IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

1. Introduzione

Nel contesto del progetto MicroBioDiverSar (Biodiversità Microbica della Sardegna), finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (Mipaaf), uno degli obiettivi principali è la realizzazione di un database delle risorse microbiche presenti in tre collezioni sarde (Agris Sardegna, Università di Sassari e Università di Cagliari) che possa valorizzare queste numerose risorse facendole conoscere e rendendole disponibili a tutti i ricercatori interessati.

In questo breve contributo vengono presentati la filosofia e l'approccio architettuale e tecnologico relativi alla creazione del database, in via di sviluppo avanzato, e viene illustrato sinteticamente il portale web.

2. Un database federato

Il database del progetto MicroBioDiverSar, al quale è stato assegnato il nome MBDS_DB, si presenta come una base dati federata che raccoglie e integra i contributi delle basi dati disponibili presso ciascuna collezione e li rende disponibili ai ricercatori in forma integrata, lasciando al contempo totale autonomia alle singole collezioni nella gestione dei dati relativi ai loro micro-organismi.

Le basi di dati locali sono destinate alla gestione dei dati presso le collezioni partecipanti. Sono basi di dati autonome, ma condividono la struttura dei dati, che è stata sviluppata tenendo conto dei più recenti standard del settore (OECD, CABRI, MIRRI). Sono sincronizzate a livello centrale per l'assegnazione di un identificativo univoco a ciascun ceppo e per la condivisione dei repertori (liste di riferimento per le informazioni codificate). MBDS_DB include quindi al momento tre basi di dati locali, una ciascuno per le collezioni di Agris Sardegna (BNSS), Università di Cagliari (UNICA) e Università di Sassari (UNISS), ma può essere esteso per comprenderne altre.

La gestione dei dati a livello locale consente di aggiornare le informazioni senza bisogno di collegamento Internet e di sottomettere gli aggiornamenti successivamente alla base di dati federata per la condivisione e pubblicazione on-line. La base di dati federata comprende tutte le informazioni

archivate nelle basi dati locali. Queste sono archiviate separatamente per facilitare l'aggiornamento. L'accesso alla base di dati federata è destinato principalmente agli utenti esterni per le ricerche sui micro-organismi disponibili presso le collezioni. Tale accesso è effettuato tramite una pagina dedicata del sito del progetto, il portale della Biodiversità Microbica della Sardegna, e consente esclusivamente di effettuare ricerche sul database. Un accesso diretto al database è consentito ai curatori delle collezioni e a un amministratore esterno tramite un indirizzo Internet specifico, riservato.

3. Le funzionalità di MBDS_DB

Tramite il modulo di ricerca di base è possibile effettuare ricerche per codice unico dei micro-organismi disponibili nelle collezioni (strain number), per specie e per substrato. È in fase di sviluppo un modulo di ricerca avanzato che consentirà di effettuare ricerche anche sulle informazioni relative al campionamento (località e data) e su alcune caratteristiche fisico-chimiche (principalmente, molecole in grado di inibire i microorganismi e molecole che sono metabolizzate da essi).

L'inserimento di un nuovo ceppo, per il quale non siano ancora disponibili informazioni nella base dati, avviene in collegamento con il database federato per consentire l'assegnazione di un identificativo numerico unico. È quindi necessario che le collezioni siano collegate a Internet per poterlo effettuare. L'inserimento si realizza indicando un insieme minimo di informazioni obbligatorie: collezione di appartenenza, codice assegnato al ceppo (strain number), tipo di organismo e specie. È possibile inoltre indicare un progetto di riferimento, il nome assegnato originalmente al ceppo e strain number eventualmente associati al ceppo da altre collezioni.

L'aggiornamento di un ceppo può essere effettuato localmente o in remoto. Le informazioni relative al ceppo sono suddivise in 11 sezioni distinte, alle quali si accede dopo aver indicato il ceppo da aggiornare tramite il suo strain number o il suo nome originale presso la collezione.

Le sezioni distinte consentono di aggiornare separatamente, anche in tempi successivi, i dati relativi a identità del ceppo, identificazione, forme e condizioni di distribuzione, origine, isolamento, proprietà chimico-fisiche, inibizioni, utilizzi, bibliografia, note e gestione in laboratorio.

4. Utenti e diritti di accesso

MBDS_DB è pubblicamente accessibile tramite il portale, ma solo per la ricerca. Per la gestione dei dati locali, sono state definite tre tipologie di utenti: l'amministratore di sistema, il curatore dei dati e l'utente di base.

L'amministratore di sistema è responsabile della base dati locali e della sua sincronizzazione con la base dati centrale e, in particolare, ha la responsabilità di aggiornare le liste di riferimento inserendo i valori che sono necessari per la descrizione dei micro-organismi della collezione. Ad esempio, può inserire il valore per un substrato o per una località geografica che non siano già compresi nelle relative liste. Le liste di riferimento sono aggiornate a livello federato e gli aggiornamenti sono immediatamente disponibili anche alle altre collezioni. Inoltre, in accordo con gli altri amministratori, l'amministratore di sistema può modificare la struttura dati tramite il software phpmyadmin.

Il curatore è il responsabile dei dati relativi ai ceppi inseriti nel catalogo. Può quindi inserire nuovi ceppi e aggiornare le informazioni sui ceppi già inclusi, ma non può aggiornare le liste di riferimento. L'utente di base può solo effettuare ricerche e scaricare i dati.

Per ogni collezione, sono stati creati utenti di ciascuna tipologia. Mentre l'attività dell'amministratore di sistema di una collezione che aggiorna una lista di riferimento influisce anche sulle altre collezioni, i curatori hanno diritto di aggiornamento solo per la loro collezione e la loro attività si limita quindi alla sola collezione da essi curata.

5. Struttura del database

Il database MBDS_DB si basa su alcune tabelle condivise e su alcune tabelle destinate unicamente a ciascuna collezione. Le tabelle condivise sono tabelle di riferimento per le informazioni codificate nel database. Le principali tabelle condivise fanno riferimento a specie, habitat, substrati, località geografiche, mezzi di coltura, composti chimici, riferimenti bibliografici. Queste tabelle sono disponibili nelle basi di dati locali, ma il loro aggiornamento può essere effettuato solo on-line, in collegamento con il database federato.

Le tabelle specifiche delle collezioni contengono i dati sui micro-organismi della collezione. La maggior parte delle informazioni non codificate, cioè espresse a testo libero, sono incluse nella tabella di base dei ceppi. Le proprietà chimico-fisiche sono inserite in una tabella separata per semplicità di gestione. Le informazioni codificate possono essere incluse nella tabella di base, quando il dato è unico, o in specifiche tabelle di collegamento, quando per un dato ceppo si possono avere più informazioni. Ad esempio, per ogni ceppo è indicata una sola specie e il dato relativo è incluso nella tabella di base, ma possono essere indicati più riferimenti bibliografici, e i relativi riferimenti sono inclusi in una tabella di collegamento.

Sia le tabelle di base che quelle di collegamento vengono aggiornate nella base dati locale da ciascuna collezione.

6. Sincronizzazione

La base dati federata e le basi dati locali devono essere mantenute sincronizzate e la sincronizzazione deve avvenire in entrambe le direzioni. Le tabelle di base e quelle di collegamento, che sono aggiornate presso le collezioni, devono essere sottomesse alla base dati federata per consentire la ricerca agli utenti esterni, mentre le tabelle di riferimento, che sono aggiornate a livello centrale, devono essere trasferite dalla base dati federata a tutte le basi di dati locali.

L'aggiornamento delle basi di dati locali avviene a ogni avvio del sistema locale e a ogni utilizzo delle tabelle di riferimento, se in quel momento è attivo il collegamento Internet. Inoltre, quando viene aggiornata una tabella di riferimento nel sistema centrale, la tabella stessa viene aggiornata contestualmente presso la collezione che ha effettuato l'aggiornamento. L'aggiornamento della base dati federata avviene su richiesta della collezione tramite un'apposita funzione e può essere effettuato in qualunque momento la collezione lo ritenga opportuno.

7. Ambiente di sviluppo

Nella scelta del software per lo sviluppo del database è stato privilegiato l’open source. In particolare, si è deciso di appoggiarsi all’ambiente LAMP/WAMP che integra al proprio interno un server web (Apache), un software di gestione dati (MySQL) e linguaggio di programmazione (PHP), rispettivamente nei sistemi informativi Linux e Windows. Il software phpMyAdmin, che consente una facile ed efficace gestione dei dati inclusi nel database MySQL, è anche incluso negli ambienti LAMP/ WAMP. Questa scelta consente la condivisione delle applicazioni tra basi di dai locali, usualmente in ambiente Windows, e base di dati federata, installata su server virtuale in ambiente Ubuntu 18.04.5 LTS. La scelta del linguaggio PHP consente inoltre una notevole semplicità nello sviluppo e nella revisione del programma e si pone come linguaggio ideale in collegamento tra server Apache e software di gestione dati MySQL.

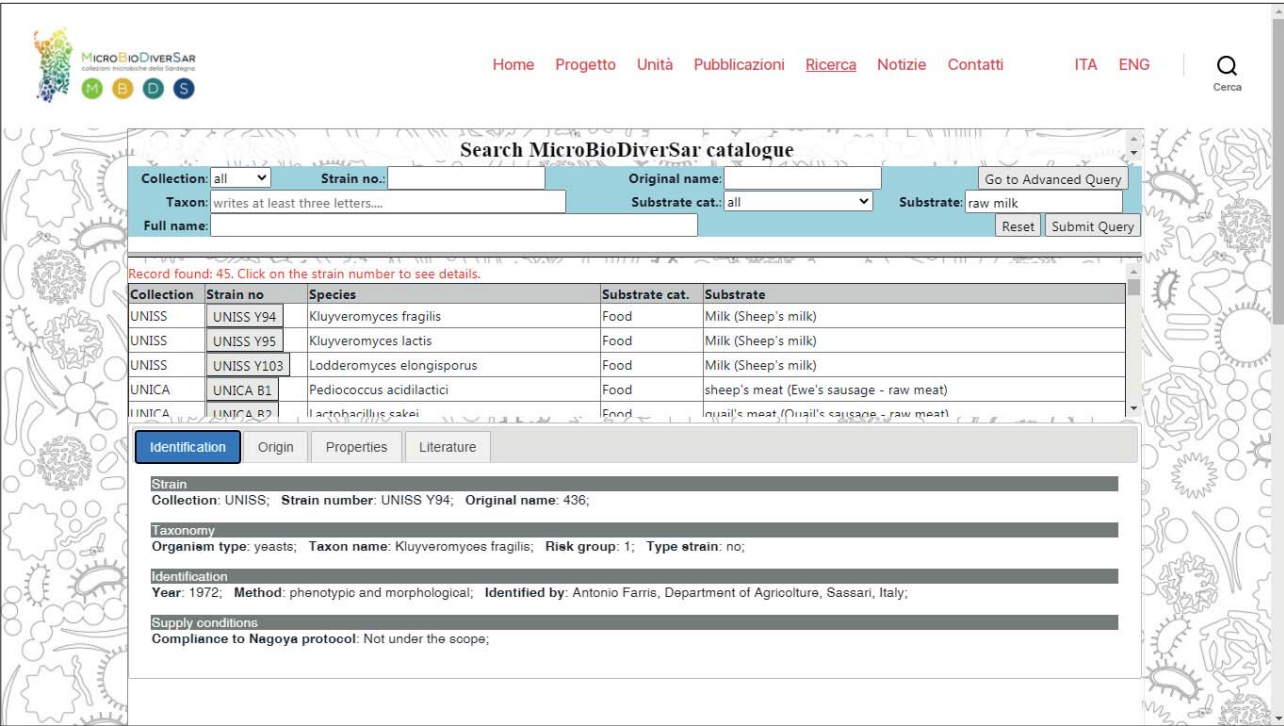


Figura 1 - Interfaccia per la ricerca di ceppi nel portale del progetto.

8. Il portale sulla Biodiversità Microbica della Sardegna

Per lo sviluppo del portale del progetto si è scelto di utilizzare uno dei più diffusi software per la gestione di siti, WordPress. Questo ha consentito tempi rapidi di sviluppo, flessibilità nella impostazione grafica, ed efficace inserimento di moduli software (plugin). Il portale è disponibile all’indirizzo www.mbds.it e include pagine in italiano e in inglese. Presenta in maniera sintetica gli obiettivi del progetto, le unità operative, e le loro pubblicazioni scientifiche. Comprende inoltre una sezione di news e la pagina dei contatti. Consente infine l’accesso a un modulo di ricerca dei ceppi mantenuti nelle collezioni partecipanti al progetto. In figura 1 è riportato un esempio di una ricerca. La pagina è suddivisa in tre parti. Nella parte

superiore è incluso il modulo di ricerca. In figura è riportata una ricerca di ceppi il cui substrato è ‘raw milk’. Nella parte centrale sono elencati i ceppi corrispondenti alla ricerca effettuata: per ciascuno di essi sono riportati la collezione della quale fa parte il ceppo, il suo strain number, la specie e informazioni sul substrato. Nella parte inferiore, infine, sono riportati i dati relativi a uno dei ceppi elencati, dopo averlo selezionato dall’elenco. Le informazioni sono suddivise per tipologia. In figura sono visualizzate quelle relative all’identità del ceppo, mentre le altre informazioni sono visualizzabili selezionando uno delle etichette ‘Identification’, ‘Origin’, ‘Properties’, ‘Literature’, ‘Notes’. In figura 2 è presentata la pagina del portale relativa ai contatti del progetto e dei partner.

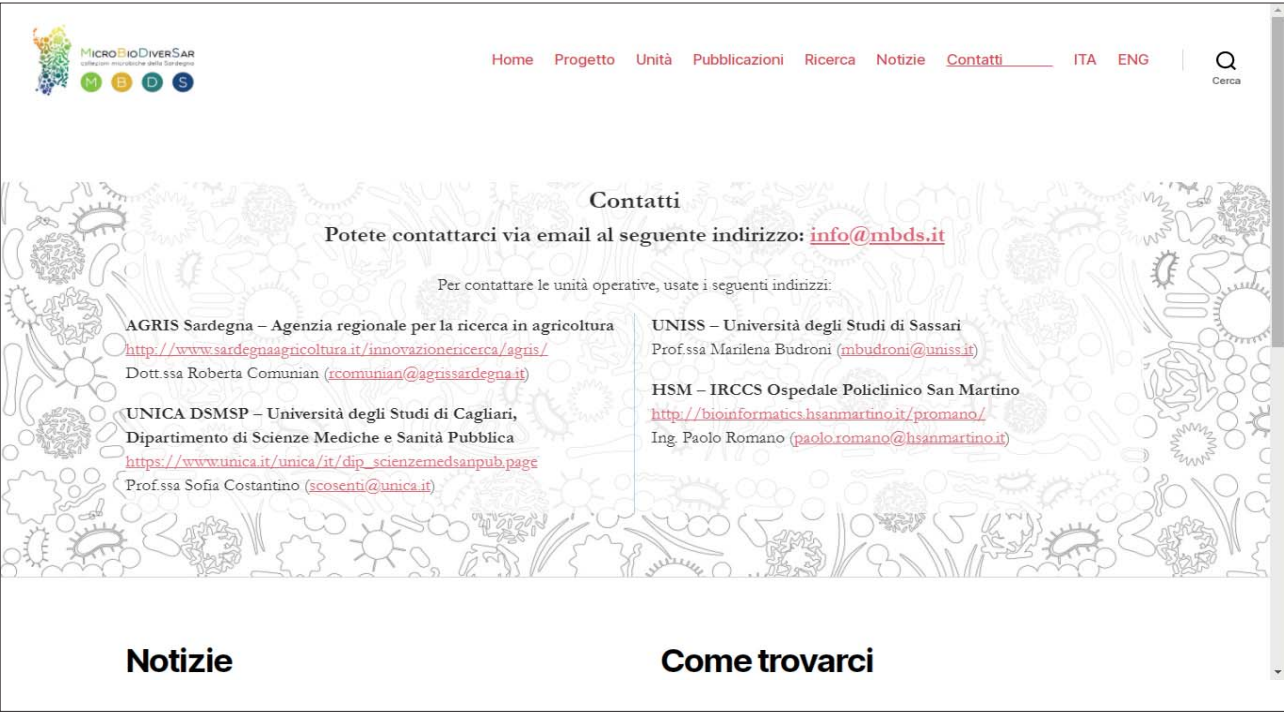
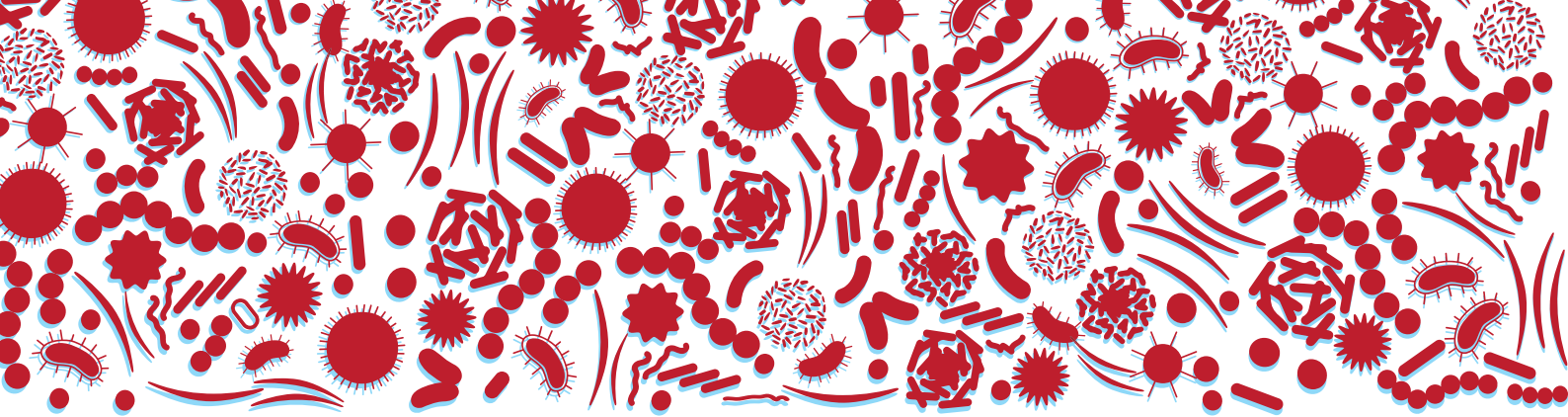


Figura 2 - Pagina dei contatti nel portale del progetto.

4. Conclusione

In questo breve contributo sono state presentate le scelte progettuali e l’architettura del database MBDS_DB, relativo alle collezioni di micro-organismi delle collezioni di Agris Sardegna, Università di Cagliari e Università di Sassari. A conclusione del progetto, il sistema sarà messo pubblicamente a disposizione dei ricercatori interessati tramite il portale www.mbds.it e contribuirà alla valorizzazione dei micro-organismi della Sardegna e potrà altresì sostenere lo sviluppo della ricerca e dell’industria regionale e nazionale.



Le collezioni e la Joint Research Unit (JRU) MIRRI.IT: il network italiano delle risorse microbiche

Giovanna Cristina Varese, Iolanda Perugini

Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi

1. L'infrastruttura europea MIRRI (Microbial Resource Research Infrastructure) a livello Europeo

Lanciata nel 2012, l'infrastruttura paneuropea di ricerca sulle risorse microbiche (MIRRI – www.mirri.org) fa parte del panorama ESFRI di Health & Food, Research Infrastructure (H&F RI). Attualmente più di 50 istituti di ricerca pubblici di 9 paesi europei (Portogallo, Spagna, Francia, Belgio, Olanda, Italia, Grecia, Polonia, Lettonia) e di un paese associato (Russia) collaborano per costituire MIRRI come un consorzio europeo per le infrastrutture di ricerca (ERIC) ai sensi del diritto dell'UE. La visione di MIRRI è quella di essere una piattaforma paneuropea con elevate potenzialità che aggiunge valore alla biodiversità microbica conosciuta e ancora sconosciuta e che valorizza biorisorse e competenze per accelerare e catalizzare nuove conoscenze e supportare la bioeconomia. MIRRI mira a fornire un ambiente di lavoro collaborativo che grazie alla sua rete diffusa di Centri di Risorse Biologiche possa facilitare l'accesso a oltre 300.000 isolati microbici (archea, batteri, lieviti, funghi, alghe, virus, etc.) conservati con elevati standard di qualità, loro derivati e relativi metadati. Nella consapevolezza che i microrganismi sono alla base di tutti i settori biotecnologici (farmaceutico, cosmetico, alimentare, ambientale, etc), MIRRI offre una vasta gamma di servizi e competenze al mondo accademico e industriale: dall'isolamento, identificazione, caratterizzazione, conservazione e distribuzione di microorganismi, alla consulenza industriale con contratti di ricerca personalizzati, alla creazione di corsi di formazione "on demand". L'infrastruttura MIRRI inoltre fornisce risorse e servizi nel pieno rispetto delle normative nazionali e internazionali, incluso il protocollo di Nagoya. Il suo scopo è quindi quello di unire ricerca, istruzione e industria per promuovere la responsabilità globale nei confronti della biodiversità e costruire un'Europa innovativa. Attualmente MIRRI lavora in sinergia e complementarità con numerose altre Infrastrutture di Ricerca Europee ed è impegnata all'interno di progettualità a livello continentale come RItrain, CORBEL RI-VIS and EOSC-Life. Ciò permetterà di avere un potente strumento per migliorare la ricerca, lo sviluppo e l'applicazione tecnologica nel rispetto delle normative vigenti, fornendo servizi di qualità elevata ai centri di ricerca pubblici e privati.

2. La Joint Research Unit MIRRI-IT

Al fine di raccordare l'attività svolta a livello europeo dall'infrastruttura MIRRI, con le attività svolte a livello nazionale, nel 2017 è stata sottoscritta una Joint Research Unit (JRU) denominata MIRRI-IT (www.mirri-it.it). La JRU MIRRI-IT ha lo scopo di promuovere e facilitare l'adesione Italiana all'infrastruttura europea MIRRI, favorendo un'ampia partecipazione della comunità scientifica nazionale, massimizzando gli investimenti per la ricerca nel nostro Paese (De Vero et al., 2019). La JRU MIRRI-IT contribuirà alle attività di MIRRI a livello europeo coordinando l'accesso alle collezioni microbiologiche italiane e alle loro risorse, ai servizi di ricerca e alle attività di formazione interdisciplinare erogata dal nodo italiano. La Governance della JRU MIRRI-IT è definita nel testo dell'accordo sottoscritto nel 2017 e precisata nel regolamento di funzionamento che prevede: 1) Comitato di Coordinamento eletto dall'Assemblea Generale con compiti esecutivi; 2) un'Assemblea Generale con compiti decisionali e consultivi; 3) un Comitato Scientifico con compiti consultivi e di supporto scientifico. Attualmente la JRU annovera 5 partner e 16 Membri Associati (Tabella 1) distribuiti su tutto il territorio nazionale. La missione della JRU MIRRI-IT è superare la frammentazione nella disponibilità delle risorse e dei servizi offerti dal sistema italiano delle collezioni di microrganismi potenziando il sistema di gestione della qualità delle collezioni, focalizzandosi sui bisogni e sulle sfide degli stakeholder interessati all'applicazione biotecnologica di queste risorse. Più nel dettaglio la JRU MIRRI-IT fornisce i seguenti servizi alla comunità scientifica e industriale:

- a.** garantisce l'accesso giuridicamente protetto e compatibile con le prescrizioni normative alle risorse microbiche e loro derivati nonché ai dati ad esse associati per garantire le esigenze di ricerca e sviluppo della comunità scientifica e industriale;
- b.** favorisce la diffusione delle informazioni a tutte le tipologie di utenti attraverso la creazione di una piattaforma comune;
- c.** fornisce un unico punto di accesso che gli utenti possono consultare per ottenere rapidamente informazioni circa i ceppi microbici sul territorio nazionale ed europeo, i gruppi di esperti, i servizi erogati, le grandi attrezzature disponibili;
- d.** migliora la complementarità dei singoli Centri per le Risorse Biologiche nel dominio dei microrganismi evitando le eccessive ridondanze, condividendo le risorse microbiologiche, le grandi attrezzature, le buone pratiche e valorizzando le conoscenze presenti nelle diverse collezioni;
- e.** implementa la gestione in qualità delle collezioni microbiche innalzandole a livelli di standard internazionale per garantire la qualità del materiale, dei dati e dei servizi forniti;
- f.** svolge servizi di valorizzazione delle sinergie e di raggruppamento di competenze dei centri di ricerca per le istituzioni pubbliche e private e lanciare attività congiunte;
- g.** favorisce il trasferimento tecnologico e delle conoscenze alla società civile e industriale aumentando la competitività a livello internazionale grazie alla creazione del network nazionale;
- h.** fornisce l'accesso coordinato degli utenti esterni alle infrastrutture di ricerca per consentire ai ricercatori delle aziende e degli mBRC di svolgere attività di ricerca inhouse;
- i.** coinvolge la comunità di ricercatori e tecnologi nell'applicazione di norme comuni, di condivisione di tecnologie e di conoscenza e nel coordinarsi per risolvere i problemi operativi e nell'indirizzare le esigenze della comunità degli utenti;
- j.** eroga formazione e istruzione nel campo della microbiologia.

Tabella 1 - Elenco dei Partner e Membri Aassociati della JRU MIRRI-IT e informazioni sulle relative collezioni

Partner della JRU MIRRI-IT	Collezioni di microorganismi	Risorse Biologiche	Origine
Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)	Agro-Food Microbial Culture Collection (ITEM)	Batteri, Lieviti, Funghi filamentosi	Alimenti, Animali, Ambiente, Piante
	Plant Virus Italy (PLAVIT)	Micovirus, Fitoplasmi, Fagi, Virus vegetali	Funghi, Piante
Istituto San Martino di Genova	Interlab Cell Line Collection (ICLC)	Linee cellulari	Uomo
Università di Modena e Reggio Emilia	Unimore Microbial Culture Collection (UMCC)	Batteri, Lieviti	Alimenti, Bevande
Università di Perugia	Industrial Yeasts Collection (DBVPG)	Lieviti	Bevande, Alimenti, Ambiente
Università di Torino	Turin University Culture Collection (TUCC) including Mycotheca Universitatis Taurinensis (MUT)	Batteri, Lieviti, Funghi filamentosi	Uomo, Animali, Piante, Alimenti, Bevande, Ambiente
Membri Associati della JRU MIRRI-IT			
Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA)	ENEA collection	Batteri, Funghi filamentosi, Microalghe, Virus, Consorzi microbici	Ambiente
Agenzia regionale per la ricerca in agricoltura, (Agris Sardegna)	Bonassai (BNSS)	Batteri	Alimenti, Animali
Istituto Nazionale di Oceanografia e di Geofisica Sperimentale, Trieste (OGS)	Collection of Sea Microorganisms (COSMI)	Microalghe	Ambienti marini
Istituto Nazionale Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani", Roma	INMI collection	Batteri, Lieviti	Uomo
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)	Biobank of Veterinary Resources (BVR)	Batteri, Funghi, parassiti, Virus, Linee cellulari	Animali, Alimenti, Mangimi, Ambiente
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE)	European Union Reference Laboratory (EURL) Biobank	Virus	Animali
Università della Basilicata	UNIBAS Yeast Collection (UBYC)	Lieviti	Alimenti e Bevande

Partner della JRU MIRRI-IT	Collezioni di microorganismi	Risorse Biologiche	Origine
Università di Cagliari	DSMSP Collection	Batteri, Lieviti, Funghi filamentosi	Alimenti, Bevande, Ambiente
Università di Milano bicocca	MicroMiB collection (MicroMib)	Batteri, Lieviti, Virus	Uomo, alimenti, Ambiente
Università di Napoli Federico II	Algal Collection University Federico II (ACUF)	Cianobatteri, Microalghe	Ambiente
Università di Palermo	Herbarium SAF (SAF)	Funghi filamentosi	Ambiente
Università di Pavia	Amico Fungo	Lieviti, funghi filamentosi	Ambiente
Università di Sassari	Microbial Culture Collection of University of Sassari (UNISS)	Batteri, Lieviti, Funghi filamentosi	Uomo, Animali, Piante, Alimenti e Bevande
Università Sapienza di Roma	Fungal Biodiversity Laboratory (FBL)	Funghi filamentosi	Ambiente
Università Tuscia di Viterbo	Culture Collection of Fungi from Extreme Environments (CCFEE)	Lieviti, Licheni, Funghi filamentosi	Ambiente

Come unica infrastruttura dedicata alle risorse genetiche microbiche, MIRRI è un elemento essenziale per le Strategie di Specializzazione Intelligente (S3 - Smart Specialization Strategy) di tutte le Regioni in cui sono presenti sistemi di Ricerca, Sviluppo tecnologico e Innovazione articolati, con la presenza di Atenei, centri di ricerca pubblici e privati e Parchi scientifici e tecnologici. MIRRI contribuirà alle Strategie di sviluppo regionali andando a toccare settori quali Agrifood (es. biofertilizzanti e biopesticidi per agricoltura sostenibile, colture starter, protettive o aromatiche per la produzione di alimenti fermentati), il benessere della popolazione (es. nutraceutici, probiotici, microbiomi umani per una medicina personalizzata), contribuirà a preservare e valorizzare la biodiversità terrestre e marina per combattere i cambiamenti climatici con azioni di mitigazione (es. biocarburanti, sequestro del carbonio, ecc.) e contribuirà all’innovazione industriale (es. nuovi farmaci, cosmetici e enzimi prodotti da microrganismi).

Scopo della JRU MIRRI-IT è anche stimolare la ricerca, lo sviluppo e l’innovazione nella Bioeconomia e dell’Economia Circolare (es. biorisanamento del suolo, trattamenti rifiuti e delle acque reflue, nuovi biomateriali) e garantendo un’istruzione di qualità e opportunità di apprendimento permanente fornendo, ad esempio corsi di formazione personalizzati per le aziende e materiali didattici per scuole primarie e secondarie.

MIRRI ha un profilo unico nel panorama europeo e a livello nazionale con un elevato potenziale sinergico per lavorare con altre Infrastrutture di Ricerca. In particolare le biobanche della JRU MIRRI-IT fungono da catalizzatori dell’innovazione e consentono a imprese, ricercatori, pubblica amministrazione e utenti di interagire e sperimentare in sinergia nuove tecnologie, applicazioni, prodotti, nonché di erogare di servizi per rafforzare la competitività del sistema economico e produttivo nel contesto internazionale per migliorare il benessere dei cittadini, valorizzando la biodiversità microbica in un’ottica di biobased e green economy come sottolineato a livello europeo da recenti

documenti (New Green Deal, Strategia Europea per la Biodiversità, ecc.), interessando tutti i settori strategici dell’economia italiana, e, più in generale, supportando pienamente il Made in Italy.

3. Impatto della JRU MIRRI-IT sul territorio nazionale

La JRU MIRRI-IT è un’infrastruttura unica in Italia che punta alla valorizzazione delle risorse microbiche per aiutare a risolvere le grandi sfide della società. La fornitura di risorse microbiche ben caratterizzate, sequenziate e con una precisa posizione tassonomica è una componente essenziale per attuare le strategie comunitarie in materia di bioeconomia e biodiversità. Questo incide in settori strategici come ad esempio il comparto agroalimentare. MIRRI può contribuire sia a un gestione sostenibile dell’ambiente sia ad un ottimizzazione dei processi produttivi (es. colture starter, processi di fermentazione), delle biotecnologie industriali (es. nuovi enzimi e processi biocatalitici, produzione di biocarburanti, cosmetici), e nel settore sanitario (vaccini, antibiotici, terapia dei fagi, diagnostica). La JRU MIRRI-IT sta collaborando a livello nazionale ed europeo fornendo linee guida per la conservazione in condizioni ottimali, non solo delle colture pure, ma anche dei microbiomi, superando così una delle principali problematiche del settore e contribuendo a trovare risposte alle molte sfide ambientali quali la perdita di biodiversità, i cambiamenti climatici, l’inquinamento e l’esaurimento delle risorse naturali con soluzioni adeguate basate sulla conoscenza del ruolo dei vari biomi per gestire correttamente i servizi ecosistemici di ambienti terrestri e marini (Figura 1).

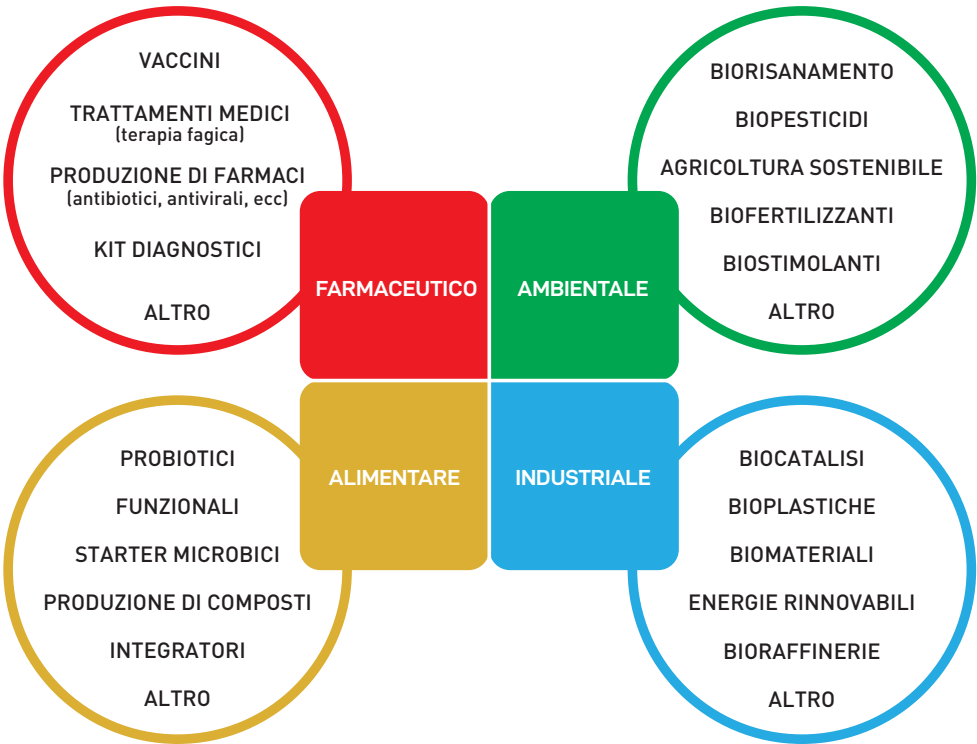


Figura 1 - Esempi di applicazioni di microrganismi in differenti settori biotecnologici

Attraverso le più avanzate tecniche di culturomica, la JRU MIRRI-IT supporta la caratterizzazione e la conservazione della biodiversità microbica, con particolare riferimento alla “dark matter” (99% della micro-biodiversità non coltivabile in condizioni standard) per accedere, conservare e valorizzare la biodiversità microbica ancora inesplorata e fondamentale per affrontare le sfide sociali future.

La JRU MIRRI-IT integra le capacità generate internamente dai suoi partner con quelle di partner esterni (altre infrastrutture di ricerca attive sul territorio nazionale ed europeo, il comparto industriale) per stabilire pipeline di servizi interconnessi e set di dati per accelerare il passaggio dalle risorse microbiologiche a nuovi processi/prodotti sul mercato.

Inoltre, molte delle biobanche legate alla JRU, agiscono in settori strategici per il nostro Paese, contribuendo a promuovere il trasferimento di conoscenze, l’istruzione e la formazione al di fuori delle carriere accademiche tradizionali. Operando all’interfaccia tra ricerca pubblica e industriale, MIRRI svolge un ruolo traslazionale, aggregando risultati di base e conoscenza per sviluppare nuovi know-how e favorire il trasferimento tecnologico e la bioeconomia.

Le biobanche di MIRRI, inoltre, svolgono un enorme e imprescindibile lavoro per la società, economicamente non quantificabile, all’interno delle Istituzioni in cui operano. Ad esempio, gli Istituti Zooprofilattici e le Collezioni ospitate all’interno di strutture ospedaliere sono quotidianamente coinvolti nell’identificazione e caratterizzazione di agenti eziologici coinvolti in differenti tipologie di malattie e nella messa a punto di nuovi sistemi diagnostici. Le Collezioni di microrganismi hanno quindi un’importanza socio-economica fondamentale per il nostro Paese.

4. Conclusioni

Una corretta conoscenza e gestione della biodiversità microbica è alla base dello sviluppo sostenibile socio-economico e ambientale di ogni paese. Nonostante il ruolo fondamentale che i microrganismi svolgono nel mantenimento degli ecosistemi naturali e nello sviluppo di applicazioni biotecnologiche, la biodiversità microbica è generalmente trascurata nei dibattiti relativi alla conservazione e gestione della biodiversità globale.

Le collezioni di microrganismi hanno un ruolo fondamentale nella conservazione, caratterizzazione, gestione e valorizzazione della biodiversità microbica per affrontare le sfide della società. Inoltre, garantendo la distribuzione di risorse microbiche (e relativi metadati) di alta qualità garantiscono la riproducibilità e quindi la qualità e credibilità della scienza nell’affrontare le grandi sfide sociali del nostro tempo.

5. Bibliografia

De Vero L., Boniotti M.B., Budroni, M.; Buzzini P., Cassanelli S., Comunian R., Gullo M., Logrieco A.F., Mannazzu I., Musumeci R., Perugini I., Perrone G., Pulvirenti A., Romano P., Turchetti B., Varese G.C. 2019. Preservation, Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity: The Perspective of the Italian Network of Culture Collections. Microorganisms 2019, 7, 685.